

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**Loisleini Fontoura Saldanha**

**ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DE TRATAMENTOS HIDROLÍTICOS PARA  
O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS**

**Santa Maria - RS  
2017**

**Loisleini Fontoura Saldanha**

**ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DE TRATAMENTOS HIDROLÍTICOS PARA  
O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Química  
Bacharelado da Universidade Federal  
de Santa Maria, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**BACHAREL EM QUÍMICA.**

**Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins**

**Santa Maria - RS  
2017**

**Loisleini Fontoura Saldanha**

**ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DE TRATAMENTOS HIDROLÍTICOS PARA  
O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Química  
Bacharelado da Universidade Federal  
de Santa Maria, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**BACHAREL EM QUÍMICA.**

**Aprovado em 07 de julho de 2017:**

---

**Dr. Ayrton Figueiredo Martins, Dr. (UFSM)**  
(Orientador)

---

**Giovanni Bressiani Pedroso, MSc. (UFSM)**

**Santa Maria - RS**  
**2017**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins pela orientação e oportunidade de fazer parte do grupo LATER durante boa parte de minha formação acadêmica.

Aos colegas do LATER pela amizade, paciência e instrução no decorrer dos mais de três anos de convivência no laboratório. Em especial menciono o doutorando Giovanni Pedroso pelos ensinamentos, conselhos e ajuda ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Às amigas Silvana, Júlia e Raiara e ao amigo Michael pelo cuidado e palavras toda vez que o desespero tomava conta. Vocês tem lugar especial no meu coração.

À minha mãe Iara, meu pai Acioli e minhas irmãs Crisciani e Schaienni pela paciência e apoio, principalmente naqueles dias em que a saudade de casa falava mais alto. Amo muito vocês.

À Deus por me permitir acreditar no meu potencial e não perder a fé diante dos obstáculos que encontro pelo caminho da vida.

## RESUMO

### ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DE TRATAMENTOS HIDROLÍTICOS PARA O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS

Autora: Loisleini Fontoura Saldanha

Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Biomassas de matriz lignocelulósica, como casca de arroz (CA) e microalga (MA) são potenciais matérias-primas para a produção de monossacarídeos fermentescíveis e seus bioprodutos. Face a isto, este trabalho teve como principal objetivo estudar e otimizar as etapas de pré-tratamento para a hidrólise e fermentação, e, para tanto, foi aplicado, inicialmente, tratamento alcalino (com NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH, CaCO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>OH), em sistema aberto, otimizado com delineamento composto central rotacional (DCCR). Subsequentemente, aplicou-se hidrólise ácida à pressão da CA (34-48 bar), usando-se HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluídos. Os experimentos de pré-tratamento, para a CA, com melhores resultados foram obtidos com KOH (65 °C, 60 min, 4,25% m v<sup>-1</sup> do álcali) e com NaOH (65 °C, 35 min, 4,25% m v<sup>-1</sup> do álcali), produzindo açúcares fermentescíveis na concentração de 24,0 e 21,7 g L<sup>-1</sup>. Na hidrólise seguinte, clorídrica à pressão, obteve-se produtividade de 12,8 g L<sup>-1</sup> (162 °C, 45 min, 2,5% v v<sup>-1</sup> de ácido) e, para a hidrólise sulfúrica à pressão, 13,5 g L<sup>-1</sup> (155 °C, 55 min, 3,5% v v<sup>-1</sup> de ácido). No caso da MA *in natura*, para a hidrólise clorídrica à pressão, obteve-se produtividade de 10,0 g L<sup>-1</sup> (150 °C, 45 min, 0,5% v v<sup>-1</sup> de ácido) e, para a hidrólise sulfúrica à pressão, 13,56 g L<sup>-1</sup> (152 °C, 55 min, 2,0% v v<sup>-1</sup> de ácido); já, para a microalga residual, obteve-se produtividade de 8,42 g L<sup>-1</sup> na hidrólise ácida à pressão, com HCl (150 °C, 40 min, 0,5% v v<sup>-1</sup> de ácido) e, 8,45 g L<sup>-1</sup>, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (140 °C, 37 min, 0,5% v v<sup>-1</sup> de ácido). A fermentabilidade dos hidrolisados foi confirmada (consumo >95% dos açúcares pelo *Rhizobium radiobacter*). A técnica analítica utilizada foi HPLC-RID, com estudo das figuras-de-mérito e validação da metodologia. Tomando como base as produtividades obtidas, é possível afirmar-se que as biomassas estudadas podem ser fontes viáveis de monossacarídeos fermentescíveis.

Palavras-chave: Casca de arroz. Microalga. Hidrólise. Fermentabilidade. Otimização multivariada.

## ABSTRACT

### STUDY AND OPTIMIZATION OF HYDROLYTICAL TREATMENTS FOR THE EASY OF USE OF BIOMASSES

Author: Loisleini Fontoura Saldanha

Adviser: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Biomasses of lignocellulosic matrix like as Rice Husk (RH) and microalgae (MA) are potential feedstocks for the production of fermentable monosaccharides and bioproducts. Thus, this research work had as main objective to study and optimize the pretreatment steps for hydrolysis and fermentation, and for this it was applied, initially, alkaline treatment (with NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH, CaCO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>OH), under atmospheric pressure, optimized by Central Composite Rotatable Design (DCCR). Subsequently, it was applied pressurized acidic hydrolysis of RH (34-48 bar), using diluted HCl and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The best results for the RH pretreatment were obtained with KOH (65 °C, 60 min, 4.25% w v<sup>-1</sup> alkali), and with NaOH (65 °C, 35 min, 4.25% w v<sup>-1</sup> alkali), producing fermentable sugars at concentrations of 24.0 e 21.7 g L<sup>-1</sup>. In the following pressurized hydrochloric hydrolysis, it was obtained productivity of 12.8 g L<sup>-1</sup> (162 °C, 45 min, 2.5% v v<sup>-1</sup> acid) and, 13.5 g L<sup>-1</sup> for the pressurized sulfuric hydrolysis (155 °C, 55 min, 3.5% v v<sup>-1</sup> acid). In the case of MA *in natura*, for pressurized hydrochloric hydrolysis, it was obtained productivity of 10.0 g L<sup>-1</sup> (150 °C, 45 min, 0.5% v v<sup>-1</sup> acid) and, for the pressurized sulfuric hydrolysis, 13.56 g L<sup>-1</sup> (152 °C, 55 min, 2.0% v v<sup>-1</sup> acid). Now, for the residual microalgae, it was obtained productivity of 8.42 g L<sup>-1</sup> by the pressurized hydrochloric hydrolysis (150 °C, 40 min, 0.5% v v<sup>-1</sup> acid) and, 8.45 g L<sup>-1</sup>, by the pressurized sulfuric hydrolysis (140 °C, 37 min, 0.5% v v<sup>-1</sup> acid). The fermentability of the hydrolysates was confirmed (consumption >95% of sugars) by the *Rhizobium radiobacter*. The analytical technique used was HPLC-RID, including study of the figures-of-merit and method validation. Based on the obtained productivities, it is possible to conclude that the studied biomasses can be looked as viable sources of fermentable monosaccharides.

Keywords: Rice husk. Microalgae. Hydrolysis. Fermentability. Multivariate optimization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Safras recentes de arroz, destacando a importância do RS na produção brasileira do grão.....	2
<b>Figura 2.</b> Constituição do arroz, sendo grão (72%), casca (20%) e farelo (8%).....	8
<b>Figura 3.</b> Aplicações em biorrefinaria de MAs.....	10
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografia da microalga <i>Chlorella</i> .....	11
<b>Figura 5.</b> Pré-tratamento aplicado à biomassas lignocelulósicas.....	12
<b>Figura 6.</b> Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) <i>in natura</i> ; b) cominuída à 288-312 mm.....	17
<b>Figura 7.</b> Amostras de MAs utilizadas nos processos: a) MA <i>Chlorella</i> sp. <i>in natura</i> ; b) MA <i>Chlorella</i> sp. residual.....	17
<b>Figura 8.</b> Processo de hidrólise alcalina em sistema aberto para: a) CA; b) MA <i>Chlorella</i> sp.; c) MA <i>Chlorella</i> sp. residual.....	18
<b>Figura 9.</b> Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida das biomassas. Componentes: (a) moinho de aço inox; (b) sistema de aquecimento/resfriamento; (c) controlador de temperatura.....	20
<b>Figura 10.</b> Processo fermentativo em escala de bancada.....	23
<b>Figura 11.</b> Sistema cromatográfico Shimadzu (Tokio, Japão).....	23
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas obtidos a partir da injeção de (a) soluções-padrão ( $\text{g L}^{-1}$ ), e subprodutos ácido fórmico e acético; e (b) amostra do monitoramento da fermentação com consumo dos açúcares.....	27
<b>Figura 13.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando-se NaOH, com os fatores-resposta para a liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises da CA.....	36
<b>Figura 14.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{Ca(OH)}_2$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.....	37
<b>Figura 15.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando KOH, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.....	38
<b>Figura 16.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{CaCO}_3$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.....	39
<b>Figura 17.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{NH}_4\text{OH}$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.....	40
<b>Figura 18.</b> Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da CA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) com a) NaOH; b) $\text{Ca(OH)}_2$ ; c) KOH; d) $\text{CaCO}_3$ ; e) $\text{NH}_4\text{OH}$ .....	42
<b>Figura 19.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.....	49
<b>Figura 20.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c), em hidrólises com a CA.....	50

<b>Figura 21.</b> Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da CA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com $\text{H}_2\text{SO}_4$ (b).....	51
<b>Figura 22.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MA.....	56
<b>Figura 23.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MA.....	57
<b>Figura 24.</b> Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da MA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com $\text{H}_2\text{SO}_4$ (b).....	58
<b>Figura 25.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MAR.....	63
<b>Figura 26.</b> Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MAR.....	63
<b>Figura 27.</b> Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da MAR, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com $\text{H}_2\text{SO}_4$ (b).....	65
<b>Figura 28.</b> Cinética do processo fermentativo ( <i>R. radiobacter</i> ) em hidrolisado destoxificado, a 30 °C em shaker, evidenciando o consumo de açúcares x tempo de fermentação.....	67



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Produtos biotecnológicos produzidos no LATER, a partir de biomassas lignocelulósicas residuais.....	3
<b>Tabela 2</b> – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a otimização do rendimento da glicose, xilose e arabinose nos processos de hidrólise alcalina das biomassas.....	19
<b>Tabela 3</b> – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a otimização do rendimento da glicose, xilose e arabinose, nos processos de hidrólise ácida da CA e MAs, em sistema Berghof.....	21
<b>Tabela 4</b> – Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise e fermentação.....	24
<b>Tabela 5</b> – Figuras-de-mérito da determinação dos analitos e subprodutos.....	28
<b>Tabela 6</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional para hidrólises com NaOH, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	30
<b>Tabela 7</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	31
<b>Tabela 8</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com KOH, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	32
<b>Tabela 9</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com $\text{CaCO}_3$ , e seus os fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	33
<b>Tabela 10</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com $\text{NH}_4\text{OH}$ , e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	34
<b>Tabela 11</b> – Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise alcalina da CA.....	35
<b>Tabela 12</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	46
<b>Tabela 13</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.....	47
<b>Tabela 14</b> - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise ácida da CA.....	48
<b>Tabela 15</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MA.....	53
<b>Tabela 16</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com o $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MA.....	54
<b>Tabela 17</b> - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise ácida da MA.....	56
<b>Tabela 18</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MAR.....	60
<b>Tabela 19</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MAR.....	61
<b>Tabela 20</b> - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos	

matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise ácida da MAR.....	62
<b>Tabela 21</b> – Fermentação com <i>R. radiobacter</i> , substratos fermentativos, fontes de Nitrogênio e Carbono, com o consumo de açúcares para cada experimento.....	66
<b>Tabela 22</b> – Custo total do processo de produção de monossacarídeos baseado no valor dos reagentes utilizados nas etapas alcalina e ácida.....	68
<b>Tabela 23</b> – Valor agregado dos monossacarídeos gerados no processo hidrolítico e de produtos passíveis de serem obtidos através destes açúcares.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CA – Casca de arroz

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional, do inglês *Central Composite Rotatable Design*

HPLC – RID - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *High performance liquid chromatography with diode refractive index detector*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LATER – Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

MA - Microalga

MAR – Microalga residual

$r^2$  – coeficiente de determinação

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado

$\lambda$  – comprimento de onda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 BIORREFINARIA.....	5
3.2 BIOMASSAS.....	6
3.2.1 Casca de arroz.....	6
3.2.2 Microalga.....	8
3.2.2.1 Microalga <i>Chlorella</i> sp.....	10
3.3 PRÉ-TRATAMENTOS EM BIOMASSA LIGNOCELILÓSICA.....	12
3.3.1 Hidrólise alcalina.....	12
3.3.2 Hidrólise ácida.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 REAGENTES.....	16
4.2 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA.....	16
4.3 HIDRÓLISE ALCALINA DA BIOMASSA.....	18
4.4 HIDRÓLISE ÁCIDA DA BIOMASSA.....	20
4.5 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO.....	21
4.6 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DOS HIDROLISADOS.....	22
4.7 MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E SUBPRODUTOS.....	23
4.8 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	26
5.1.1 Métodos cromatográficos.....	26
5.1.2 Estabilidade das amostras.....	26
5.1.3 Determinação com HPLC-RID.....	27
5.2 HIDRÓLISE ALCALINA DAS BIOMASSAS.....	28
5.2.1 Otimização da hidrólise alcalina.....	28
5.2.1.1 Hidrólises alcalinas da casca de arroz.....	29

5.2.1.2 Hidrólises alcalinas da microalga.....	44
5.3HIDRÓLISE ÁCIDA DAS BIOMASSAS.....	44
5.3.1 Otimização da hidrólise ácida.....	44
5.3.1.1 Hidrólises ácidas da casca de arroz.....	45
5.3.1.2 Hidrólises ácidas da microalga <i>Chlorella</i> sp.....	53
5.3.1.3 Hidrólises ácidas da microalga <i>Chlorella</i> sp. residual.....	59
5.4AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO.....	65
5.5AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

# 1. INTRODUÇÃO

O esgotamento dos combustíveis fósseis, os impactos causados pelo seu uso, bem como a crescente busca por maior sustentabilidade nos processos produtivos, têm impulsionado a procura por fontes renováveis de energia e matérias-primas (RODRIGUES, J. 2011; ÖZDENKÇI *et al.*, 2017). O aproveitamento de materiais renováveis em processos físico-químicos e biotecnológicos faz parte do conceito de biorrefinaria e encontra-se entre os temas mais relevantes e promissores da atualidade (RODRIGUES, J. 2011; CHOI *et al.*, 2015).

A biomassa é fonte sustentável e única, em termos de carbono, com o maior potencial para conversão em energia e bioprodutos. Pode ser qualquer material aproveitável ou rejeito, de natureza lignocelulósica (neste caso), que, pode ser submetido a tratamento que debilite as ligações do complexo celulose-hemicelulose-lignina, permitindo subsequente aproveitamento industrial (RODRIGUES, J. 2011; KARP *et al.*, 2015).

A casca de arroz (CA) é biomassa lignocelulósica abundante no sul do Brasil, subproduto do beneficiamento do grão de arroz, que é considerado o segundo cereal mais cultivado no mundo (SOSBAI, 2016). O aproveitamento da CA em biorrefinaria vem ganhando importância dada a sua abundância, já que esse subproduto representa cerca de 20% do peso do grão de arroz (FONSECA, 1999 apud DELLA *et al.*, 2001). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017), o Brasil tem previsão de colheita de 11,96 milhões de toneladas na safra 2016/2017; 70% desse montante será produzido no Rio Grande do Sul (SOSBAI, 2016) (Figura 1). Aproximadamente 2,4 milhão de toneladas de CA, sem destinação adequada e de potencial poluente, serão geradas e necessitam de solução econômica, que as processe em prol de alguma matriz produtiva.

Outro exemplo de biomassa com elevado potencial de aproveitamento, segundo o conceito de biorrefinaria, são as microalgas (MAs), um dos recursos naturais mais importantes da Terra (CHIU *et al.*, 2015). Por sua composição e forma de cultivo, as MAs são apontadas como fábricas microscópicas que geram os mais variados tipos de insumos industriais (RIDLEY, 2016). Trata-se, em suma, de uma possibilidade alternativa de produção que não representa impacto na agricultura (CANTRELL *et al.*, 2008).

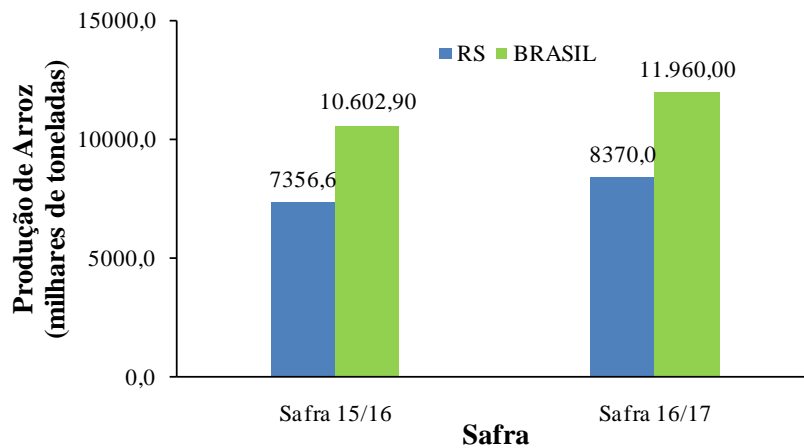


Figura 1. Safras recentes de arroz, destacando a importância do RS na produção brasileira do grão. Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017).

Com o intuito de atacar o problema da matriz recalcitrante das biomassas e tornar as frações de celulose e hemicelulose mais disponíveis para a geração de insumos e/ou produtos com valor agregado, tratamentos como a hidrólise alcalina objetivam fragmentar as estruturas da lignocelulose, diminuindo a cristalinidade (RODRIGUES, J., 2011; SILVEIRA *et al.*, 2015; KIM, LEE & KIM, 2016). O tratamento subsequente com ácidos diluídos, em temperaturas medianas, objetivam o acesso e processamento das respectivas frações da lignocelulose, iniciando pelo ataque à lignina na matriz (KARP *et al.*, 2015). Ambos os tratamentos podem apresentar razão custo/benefício positiva, desde que sejam usadas condições ótimas em termos de severidade de cada processo (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

O LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) trata do aproveitamento de matérias-primas renováveis há alguns anos, produzindo formação acadêmica de alto nível e publicação de artigos científicos em revistas internacionais, tratando de diversas rotas que permitem obter insumos químicos, como na Tabela 1. Portanto, há no LATER uma linha de pesquisa consolidada, com *know-how* próprio. A escolha das biomassas CA e MA, abundantes, se deu pelo baixo valor agregado, o que à priori vislumbra-se possível rota produtiva com caráter técnico e científico garantidos. Isto, também contribui para o fortalecimento da ideia de biorrefinaria regional, inserida em nossa realidade e com benefícios para a nossa sociedade.

Tabela 1 - Produtos biotecnológicos produzidos no LATER, a partir de biomassas lignocelulósicas residuais.

Produto	Matéria Prima	Granulometria	Tratamento	Fermentação	Microorganismo	Downstream	Produção (g L <sup>-1</sup> )	Valor agregado (R\$/t CA <sup>*</sup> )
Xilitol	Casca de Arroz	0,18 e 0,30 mm	Hidrólise Ácida	72 horas a 30°C e pH 4,5	Candidaguilliermon dii e Candidatropicalis	-	0,56	523,00
Hidroximetilfurfural	Casca de Arroz	0,18 e 0,30 mm	Hidrólise Ácida	-	-	-	0,14	27340,00
Ácido Succínico	Casca de Arroz	0,18 e 0,30 mm	Hidrólise Ácida	59 horas a 37.5°C e pH 7	A.succinogenes DSM 22257	Extração por SPE	12,6	55800,00
Ácido Levulínico	Casca de Arroz	0,18 e 0,30 mm	Hidrólise Ácida	-	-	Extração por soxhlet	18,2	58900,00
Ácido Láctico	Casca de Arroz e Bagaço de Agave	0,30 mm	Hidrólise Ácida	168 horas a 37°C e pH 6	Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863	Extração por SPE	18,8	1136,00
Ácido Itacônico	Casca de Arroz	0,30 mm	Hidrólise Ácida	84 horas a 30°C e pH 6	Aspergillus terreus (ATCC 10020)	Extração por SPE	1,9	19500,00

\*Os valores utilizados referem-se a produtos grau P.A do catálogo Sigma-Aldrich e devem ser considerados apenas como parâmetro grosseiro de avaliação do possível valor agregado máximo dos bioprodutos gerados a partir das biomassas estudadas.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho tem como objetivo o estudo das etapas de pré-tratamento de CA, MA e microalga residual (MAR) através de hidrólise alcalina seguida de hidrólise ácida à pressão, com vistas ao rendimento máximo de monossacarídeos fermentescíveis.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Proceder cominuição, peneiração, lavagem e secagem das biomassas, para submissão ao processo hidrolítico;
- Otimizar as condições de uso de hidrólise alcalina da CA, MA e MAR (como pré-tratamento para a hidrólise ácida e obtenção de monossacarídeos fermentescíveis) usando-se ferramentas multivariadas;
- Obter as condições otimizadas de hidrólise ácida à pressão da CA, MA e MAR, multivariadamente, com diferentes ácidos inorgânicos;
- Utilizar quimiometria para definir as melhores condições de tratamento em todos os processos;
- Desenvolver metodologia analítica validada (cromatográfica) para a determinação de açúcares, interferentes e concomitantes resultantes do processo hidrolítico e fermentativo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biorrefinaria

Atualmente, todo o processo que leve à geração de produtos e insumos químicos sem o petróleo como base deve ser encorajado, não apenas diante dos ganhos de sustentabilidade, mas também em termos de futuro da humanidade (RODRIGUES, J., 2011; CHOI *et al.*, 2015).

Conceitua-se a biorrefinaria, primordialmente, como um procedimento sustentável, que incorpora os processos de conversão de biomassa para produzir energia, combustíveis e produtos químicos de valor agregado (REE & ANNEVELINK, 2007).

A biomassa é qualquer material, rejeito ou subproduto com potencial sustentável e com elevado teor de carbono, com potencial para a geração de insumos químicos e produção de energia, seja por sua abundância, seja pelo baixo valor agregado que lhe é característico (RODRIGUES, J., 2011).

A biomassa, sobretudo aquela resultante de atividade agropecuária ou de beneficiamento, em geral, de natureza lignocelulósica, pela submissão a tratamento que rompa as ligações entre celulose, hemicelulose e lignina, pode gerar vários bioprodutos com valor agregado (KARP *et al.*, 2015).

As biorrefinarias vem se desenvolvendo, historicamente, com vistas a ampliar a produtividade na conversão de biomassas em um leque de bioprodutos, visando substituir a matriz petroquímica (FITZPATRICK *et al.*, 2010; PARAJULI *et al.*, 2017).

A biorrefinaria é dividida como sendo de primeira geração (competem pelas matérias-primas usadas também para alimentação ou ração) e de segunda geração (matérias-primas residuais ou de produtos não comestíveis) (LUQUE *et al.*, 2008 apud ÖZDENKÇI *et al.*, 2017). Dois exemplos de biorrefinaria de primeira geração são a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e a produção de bioetanol a partir de culturas com potencial energético (como milho, trigo e cana-de-açúcar) (ÖZDENKÇI *et al.*, 2017).

Ainda, a utilização de biomassas de primeira geração compromete algumas necessidades básicas como o uso da terra, consumo de água e a produção alimentícia. Por meio de processos mais sofisticados – com maior custo e

severidade de ataque à matriz da biomassa - a biorrefinaria de segunda geração usa matérias-primas residuais (como casca, palha e serragem) e/ou outros materiais não comestíveis (ÖZDENKÇI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, novas tecnologias utilizam como matéria-prima fontes antes não exploradas, como as MAs, compondo a biorrefinaria de terceira geração (ALVIM *et al.*, 2014). A vantagem da utilização de microalgas como matéria-prima frente a outras biomassas é que essas possuem capacidade de reprodução rápida o ano todo, capturam CO<sub>2</sub> atmosférico, necessitam menos água do que as plantas, não competem pelo uso da terra, e podem ser cultiváveis em águas salobras e terras não aráveis. Ademais, as MAs possuem alto teor de óleo (BORGES, 2010).

Fica evidente, pois, como a bioconversão de materiais diversos (baixo valor agregado e não alimentícios) possui caráter promissor, o que dá ênfase a seu aproveitamento para a produção sustentável e inovadora de insumos químicos (LIM & LEE, 2013). O aproveitamento de todas as matérias-primas abundantes, em biorrefinarias, tem enorme potencial inexplorado, sobretudo em nosso país (DEMIRBAS, 2011).

## **3.2 Biomassas**

### **3.2.1 Casca de arroz**

A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico renovável mais abundante da terra (ZHANG & LYND, 2004). Apenas nos EUA o potencial de produção é de mais de 1,3 bilhões de toneladas (base seca) de biomassa lignocelulósica, anualmente (REDDY & YANG, 2005). Segundo ZHANG (2008), para produzir entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico é necessário um bilhão de toneladas de biomassa seca.

No entanto, para a obtenção de sistemas economicamente viáveis e sustentáveis se faz necessário à utilização eficaz e total das frações das matérias-primas, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina (GALBE & ZACCHI, 2007). Conforme DAS & SINGH (2004), o consumo de celulose mundial, é proporcional ao consumo de cereais e três vezes maior do que o consumo de aço, indicando a

relevância desse material, e as pesquisas com foco em seu aproveitamento crescente.

A produção de bioprodutos via conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis vem sendo apontada como possibilidade promissora para satisfazer à necessidade mundial por combustíveis e insumos químicos. Embora existam tecnologias acessíveis para o processamento de celulose, a maioria delas se depara com obstáculos técnicos e econômicos (SANTOS *et al.*, 2012)

Nesse contexto, uma forma eficiente e economicamente viável de desfazer a parede celular e tornar os polissacarídeos disponíveis como fonte de açúcares fermentescíveis é a maior dificuldade. O fato da celulose e hemicelulose apresentarem interações intermoleculares entre si e serem ambas recobertas por lignina, faz com que esta matriz tenha uma estrutura recalcitrante e difícil de ser desfeita, dificultando assim a conversão em monossacarídeos fermentescíveis (FENGEL & WEGENER, 1989 apud SANTOS *et al.*, 2012).

A maior fonte de carboidratos naturais é a biomassa lignocelulósica; sua composição apresenta 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e um pequeno teor de cinzas e extrativos (SANTOS *et al.*, 2012; DINIZ, 2005). Estão presentes, na CA, em torno de 82% de carboidratos, 17% de cinzas e 1% de extrativos (PEDROSO *et al.*, 2017).

Biomassa residual, lignocelulósica, abundante no sul do Brasil, a CA é subproduto do beneficiamento do grão. O arroz (*Oryza sativa*) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, correspondendo à base alimentar de mais de três bilhões de pessoas (SOSBAI, 2016). Como já destacado na introdução, sobretudo ao considera-se os números da safra da Figura 1, percebe-se a relevância da CA para o RS, maior produtor nacional do grão (com crescimento anual de 9,8% na atual safra).

A CA é caracterizada por elevada dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, o que conduz à obtenção de produtos com baixo valor nutritivo, resistência ao desgaste e elevado teor de cinzas (Figura 2). A própria unidade de beneficiamento do arroz costuma reaproveitar parte dessa casca para geração de calor e vapor através de combustão, como na parboilização dos grãos (FONSECA, 1999 apud DELLA *et al.*, 2001) – mas não sem graves problemas de incrustações em seus fornos e caldeiras, em virtude do elevado teor de sílica.

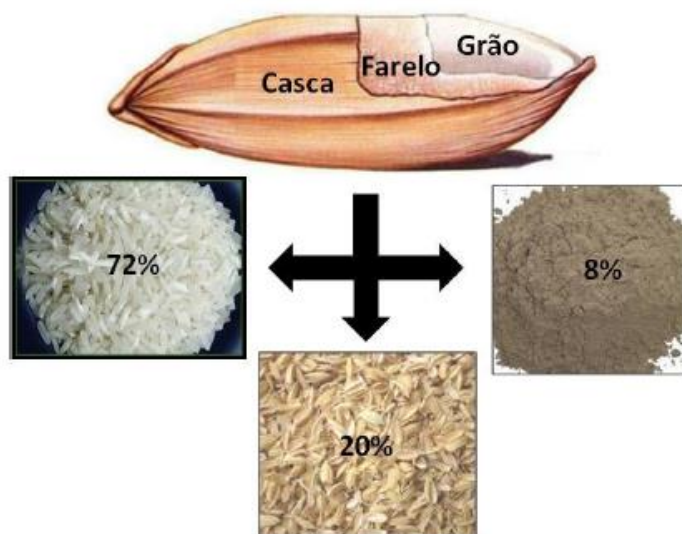


Figura 2. Constituição do arroz, sendo grão (72%), casca (20%) e farelo (8%). Fonte: PEDROSO, 2014.

Tendo em vista que o transporte da CA para descarte é economicamente desfavorável, essa casca é habitualmente eliminada por meio da queima a céu aberto com desperdício de energia e matéria-prima (com poucas exceções de reaproveitamento e queima na produção de energia), gerando ainda problemas de natureza ambiental (LIM & LEE, 2013).

Inúmeros trabalhos sobre a utilização da CA estão disponíveis na literatura, visando a produção de: etanol (BINOD *et al.*, 2010; MEGAWATI *et al.*, 2010; CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011), ácido levulínico e 5-HMF (BEVILAQUA *et al.*, 2013), xilitol (RAMBO *et al.*, 2013), ácido láctico (MONTIPÓ *et al.*, 2016), ácido succínico (BEVILAQUA *et al.*, 2015), ácido itacônico (PEDROSO *et al.*, 2017) via hidrólise ácida diluída; etanol por pré-tratamento com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e sacarificação enzimática (SAHA & COTTA, 2008); e, ademais, diversos compostos produzidos por pré-tratamento com ácido diluído seguido de hidrólise ácida concentrada ou alcalina (MA *et al.*, 2011) além do emprego de pirólise (MARTINS *et al.*, 2007).

### 3.2.2 Microalga

As MAs constituem um dos recursos naturais mais importantes da Terra, contribuindo com aproximadamente 50% da atividade fotossintética global (CHIU *et al.*, 2015). A biomassa de MAs, muito estudada, atualmente, é obtida a partir dos

próprios organismos, sejam eles procariotos ou eucariotos, de crescimento acelerado e composição química bastante diversificada. Esta biomassa tem sido utilizada na obtenção de diferentes biocombustíveis (biodiesel, etanol e bio-óleo) por possuir maior concentração, proporcionalmente, de compostos lipídicos e carboidratos, quando comparada às biomassas mais comumente utilizadas para esse fim (CARDOSO, 2011; GHOSH, ROY & DAS, 2017).

As MAs são utilizadas, também, para a alimentação de organismos aquáticos, como aditivos de rações animais, suplementação alimentar humana, fonte de antioxidantes, lipídeos, proteínas, pigmentos e compostos bioativos, além de matéria-prima para a obtenção de biocombustíveis. Dentre essas utilidades, o uso da biomassa algal faz-se muito presente nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (PRIMO *et al.*, 2015).

Grandes quantidades de proteínas, lipídeos e carboidratos estão presentes nas MAs e podem servir como matéria-prima para diferentes bioprodutos (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013). Enquanto os lipídeos de MAs podem ser utilizadas para a obtenção de biocombustíveis, os carboidratos de MAs são potenciais substitutos de fontes de carbono, tais como açúcares, ou como biomassas de primeira geração, em processos fermentativos (YEN *et al.*, 2013).

Segundo TAKEDA (1988), as microalgas são classificadas conforme os sacarídeos presentes na parede celular. OKUDA (2002) relata que a parede celular celulósica é encontrada nas divisões de microalgas como Chlorophyta, Rhodophyta e Ochrophyta. De acordo com a natureza da parede celular, faz-se necessário o uso de operações como moagem, utilização de agentes ácidos, aplicação de ultrassom, micro-ondas e homogeneização à alta pressão, antes da extração com solventes, para romper a parede celular de caráter celulósico (D'OCA *et al.*, 2011).

Para CANTRELL *et al.* (2008) o aproveitamento de MAs não apresenta impacto na agricultura, além de pressupor que haja produtividade de biomassa maior do que nas culturas de outras plantas — no que se refere à área necessária para cultivo — tendo assim um custo menor, maior viabilidade, sendo capaz de competir com as fontes fósseis.

Por sua composição e forma de cultivo, as MAs podem ser úteis na produção de diversos tipos de compostos, não apenas lipídios direcionados à indústria de biocombustíveis (RIDLEY, 2016). Diferentes carboidratos (5-23%), lipídeos (7-23%)

e proteínas (6-52%) formam estes organismos (ZHU, 2015). A utilização completa de cada fração da MA para obtenção de produtos de maior valor agregado é a melhor forma de valorizar a biomassa. Conforme mostrado na Figura 3, esse sistema industrial em que a biomassa é majoritariamente utilizada para a geração de diversos bioprodutos se enquadra no conceito de biorrefinaria já levantado anteriormente (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013; ZHU, 2015). Essa biorrefinaria abrange a produção de vários bioprodutos em cadeia de múltiplas etapas, que aproveitam totalmente as frações da matéria-prima evitando desperdício (ROUX, LAMOTTE & ACHARD, 2017).

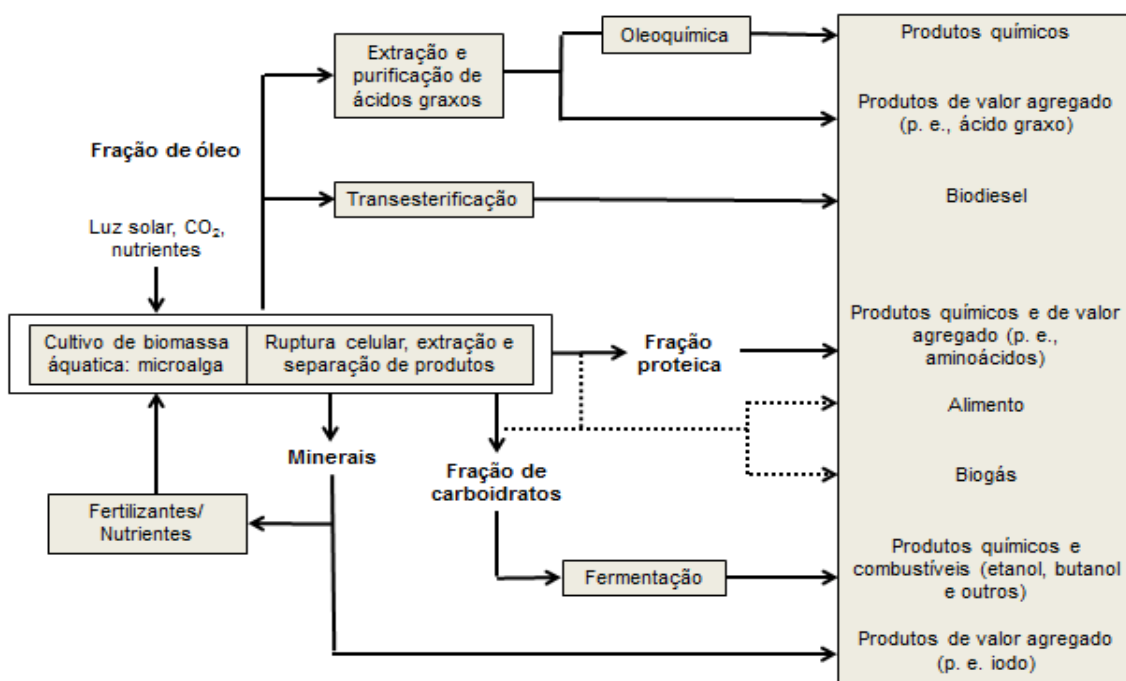


Figura 3. Aplicações em biorrefinaria de MAs. Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ, L. *et al.* (2015).

### 3.2.2.1 Microalga *Chlorella* sp.

O gênero *Chlorella* abrange MAs unicelulares, esféricas e não móveis (sem flagelos), que possuem diâmetro entre 2,0 e 10,0 µm. Apresenta espécies tanto marinhas quanto dulcícolas (PHUKAN *et al.*, 2011). A *Chlorella* faz parte do grupo das Clorófitas, ou seja, algas que possuem cloroplastos verdes envolvidos por duas

membranas (Figura 4). Assim como as paredes celulares das plantas terrestres, as das algas são formadas por pectinas e celulose, ou ainda, de proteínas ligadas aos polímeros xilose ou manose. Em muitos gêneros, as paredes celulares se apresentam cobertas com carbonato de cálcio, sílica e, menos comumente, com outros minerais como, por exemplo, o óxido de ferro (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

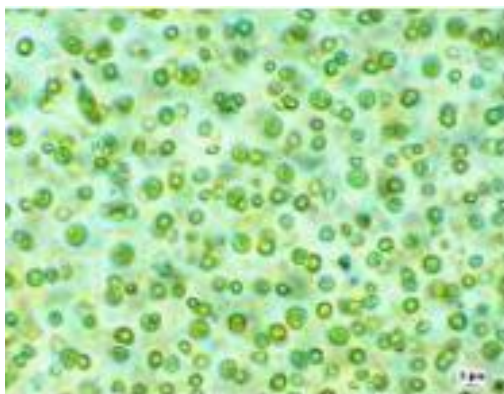


Figura 4. Fotomicrografia da microalga *Chlorella*. Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG, 2009.

Essa MA foi revelada pelos japoneses (RICHMOND, 1990). Em 1961, no Japão, foi a primeira espécie de MA a ser cultivada em larga escala para fim de comercialização como suplemento alimentar (LOURENÇO, 2006; HENRARD, 2009). A espécie *Chlorella* possui em sua composição 20% de lipídeos, 45% de proteínas, 20% de carboidratos e 10% de vitaminas e minerais (PHUKAN *et al.*, 2011). Apresenta, ainda, 2% de clorofila, pigmentos que lhe proporciona crescimento rápido, tendo em vista que seu principal metabolismo é a fotossíntese (VONSHAK, 1997).

Segundo HUNTLEY & REDALJE (2007), a MA do gênero *Chlorella* é potencial candidata para a obtenção comercial de lipídeos por apresentar crescimento rápido e cultivo fácil, com destaque para a *Chlorella* sp. como uma das espécies mais resistentes ao cultivo em tanques abertos devido a sua resiliência em suportar contaminações. Essa mesma variedade de MA é usada em pesquisas de produção de biodiesel (RASOUL-AMINI *et al.*, 2011), com base na capacidade dessa MA em adaptar-se às condições do cultivo, sendo capaz de crescer autotrófica, heterotrófica e, também, em situações intermediárias (XU, MIAO & WU, 2006).



### 3.3 Pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica

#### 3.3.1 Hidrólise alcalina

O emprego de hidrólise alcalina com o intuito de atacar a parede lignocelulósica (complexo celulose-hemicelulose-lignina) não é recente, embora ainda apresente potencial de ser investigada (Figura 5) (RODRIGUES, J., 2011).

Enquanto o uso de tratamentos hidrolíticos ácidos (ou apenas água), sob ação de calor, objetivam a facilitação do acesso às frações lignocelulósicas, por meio de ataque à lignina na matriz, o uso de tratamentos alcalinos, além de extrair a sílica e acetatos da biomassa lignocelulósica (geradores de complicações na fermentação), permitem a extração da lignina. Com foco, ainda, na viabilidade econômica do processo, um dos critérios a ser considerado é a redução de perdas de carboidratos no decorrer da hidrólise (KARP *et al.*, 2015), impasse este que é solucionado quando se faz uso de soluções de álcalis diluídos.

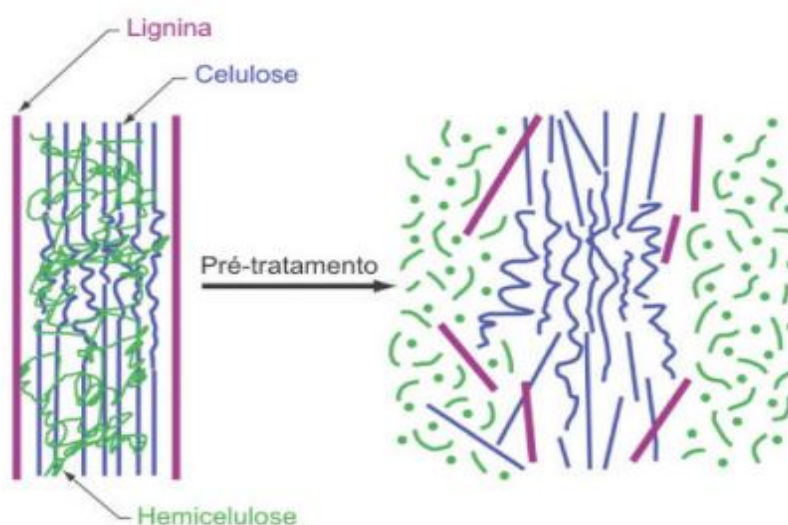


Figura 5. Pré-tratamento aplicado à biomassas lignocelulósicas. Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

Sabe-se que nas hidrólises alcalinas severas pode ocorrer despolimerização e liberação de carboidratos, mas com perdas. Regiões amorfas da biomassa são eliminadas, porém, sem que haja mudança na estrutura das frações, algo

significativo no que se refere à produtividade de açúcares desejada (KIM, LEE & KIM, 2016).

Um tratamento alcalino eficiente pode ser empregado anterior ou posteriormente à etapa de pré-tratamento (químico, físico-químico ou biológico), almejando-se maior extração de carboidratos. Extratos abundantes em lignina, produtos da degradação de açúcares e extrativos (acetatos provenientes da hemicelulose), podem ser obtidos através do uso de agentes alcalinos como hidróxido de sódio, amônio e cálcio, embora demais álcalis possam ser considerados. A etapa posterior compreende a recuperação dos compostos presentes no extrato homogêneo (LINGER *et al.*, 2014).

Pesquisas com álcalis vêm ganhando destaque em virtude do tipo de ataque à biomassa. A abordagem desses tratamentos vai além do uso de “banhos” em soluções concentradas ou diluídas, fazendo uso também de percolação cíclica com amônia, explosão das fibras de biomassa pela rápida liberação de pressão, além da associação com processos que utilizem micro-ondas e/ou ultrassom (KIM, LEE & KIM, 2016).

Pesquisas recentes têm investigado esse tema, obtendo-se resultados promissores. KARP *et al.* (2015) utilizaram gramíneas como matéria-prima, submetendo-a ao tratamento alcalino (NaOH) seguindo de hidrólise enzimática, obtendo-se fração rica em lignina sem afetar a liberação de monossacarídeos. Já a utilização de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com álcali (NaOH), seguido de hidrólise enzimática, foi usada para a produção de açúcares redutores (RODRIGUES, P., 2016), e para a avaliação da composição da fibra da casca de coco verde (CABRAL *et al.*, 2017), com resultados promissores.

### 3.3.2 Hidrólise Ácida

Biomassas, sobretudo as lignocelulósicas e/ou formadas por fração celulósica, como as deste trabalho, são exemplos claros de biomassas de segunda e terceira gerações, que apresentam o desafio de um tratamento que fragmente sua estrutura (PEDROSO *et al.*, 2017).

Em linhas gerais, alguns critérios devem ser observados na escolha da abordagem, segundo aspectos técnicos e econômicos, tais como: facilitar etapas

posterior ataque à matriz lignocelulósica, evitar condições extremas que degradem os açúcares e formem subprodutos tóxicos; possuir baixo custo de instalação, operação e manutenção; gerar o mínimo possível de resíduos; reduzir o número de etapas de operações unitárias (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

Apesar de não ser nova abordagem, a significância da hidrólise ácida deve ser lembrada dentre os tratamentos químicos aplicáveis à biomassas de segunda geração (ALVIRA *et al.*, 2010; GHANAVATI, NAHVI & KARIMI, 2015). No que remete à eficácia, a hidrólise com ácidos diluídos segue apresentando os rendimentos mais elevados, maiores que aqueles obtidos com outras abordagens (VASCONCELOS *et al.*, 2013). Em suma, devido à razão custo-benefício positiva, esta forma de tratamento de materiais lignocelulósicos é apontada como a mais comum e usual para a obtenção de açúcares fermentescíveis (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

Diferentes ácidos como o ácido sulfúrico, fosfórico e clorídrico podem ser utilizados nesse tratamento, resultando em uma fração sólida de celulose e lignina, e em uma fração líquida composta essencialmente de pentoses advindas da solubilização da hemicelulose (MUSSATTO, I. *et al.*, 2010). De acordo com as condições de processo, a fração líquida é formada por açúcares (glicose, xilose e arabinose), produtos da fragmentação da hemicelulose (ácido acético e oligômeros) e, ainda, produtos da fragmentação de monossacarídeos (5-hidroximetilfurfural e furfural) (GÁMEZ *et al.*, 2006).

Para tanto, as condições de processo como a concentração da solução ácida, em geral na faixa de 4% (v v<sup>-1</sup>), e temperaturas entre 140 e 200 °C, por períodos que podem ir de alguns minutos até cerca de uma hora (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000), são condições de otimização obrigatória. Notadamente, o processo ácido em condições de severidade intermediária possui relação custo-benefício positiva, atingindo eficiências de remoção da hemicelulose e celulose de até 90% (conversão em açúcares) (TAHERZADEH & KARIMI, 2008; RUIZ *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Outros fatores de processo a serem estudados incluem a relação sólido/líquido biomassa/solução ácida, emprego de pressão, bem como interação entre variáveis, sabendo-se que cada parâmetro pode afetar consideravelmente a

eficácia do pré-tratamento com ácidos diluídos (OVEREND, CHORNET & GASCOIGNE, 1987; PARK *et al.*, 2013).

Caso a severidade da hidrólise seja muito elevada, a degradação de açúcares (consequência indesejada) pode levar à geração de subprodutos como os ácidos levulínico, acético e fórmico, 5-HMF (hidróxi-metil-furfural) e furfural, assim como rejeitos sólidos com lignina e sílica, compostos esses que atuam como inibidores de organismos fermentativos (PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2012; KUMAR, CHEON & KIM, 2014) — embora eles mesmos possuam valor comercial apreciável (BEVILAQUA *et al.*, 2015).

Na presença desses inibidores, o metabolismo microbiano é desfavorecido, acarretando uso reduzido de açúcares e baixo desempenho de fermentação. Cada microrganismo é capaz de suportar uma concentração máxima particular desses compostos inibidores (MUSSATTO & ROBERTO, 2004). Valores elevados geram, inclusive, a morte do microrganismo por toxicidade aguda (GONZALES, R., SIVAGURUNATHAN & KIM, 2016).

GONZALES, R. *et al.* (2017) usaram a madeira de pinheiro como matéria-prima, submetendo-a a pré-tratamento com ácido diluído ( $H_2SO_4$ ) para obtenção de fração rica em açúcares e a posterior produção de hidrogênio por fermentação. Já VASCONCELOS *et al.* (2013), pré-trataram cana-de-açúcar com ácido fosfórico diluído para a produção de açúcares fermentescíveis, com elevado rendimento de processo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico ou superior, conforme descrito a seguir: ácidos clorídrico, sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha), acético e fórmico (J.T.Baker, Xalostoc, México), caldo nutriente e extrato de levedura (Acumedia, Lansing, EUA), carvão ativado, hidróxidos de cálcio, potássio, sódio, amônio e carbonato de cálcio (Exodo, Hortolândia, Brasil), glicose, xilose e arabinose da Sygma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções injetadas no sistema cromatográfico foram preparadas com água ultrapura (MerckMillipore, Billerica, MA, EUA) e acetonitrila, grau HPLC (St. Louis, MO, EUA).

### 4.2 Pré-tratamento da biomassa

Uma das matérias-primas utilizadas ao longo do trabalho, a CA, foi obtida de forma gratuita da empresa de beneficiamento de arroz Alfredo Berleze & Irmãos, de Santa Maria, RS (Estrada Ângelo Berleze, S/N, CEP 97095-640). Inicialmente, a CA foi submetida a pré-tratamento físico consistindo de cominuição em moinho analítico de facas (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), visando aumento da área superficial e redução da cristalinidade da fração lignocelulósica, e, em seguida, seleção das partículas da biomassa em sistema de peneiras padronizadas, providas de agitação automática (Bertel, Laranjeiras Caieiras, SP, Brasil). A fração de partículas com diâmetro entre 288-312  $\mu\text{m}$  (dimensões ideais definida em testes iniciais) foram selecionadas e lavadas com água destilada até filtrado incolor e, então, secas em estufa (60 °C, por 24 h) (Figura 6).

As matérias-primas MA *Chlorella* sp. e MAR *Chlorella* sp. foram obtidas de uma parceria com o Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS (Figura 7).

A MA *Chlorella* sp. obtida comercialmente (Purifarma, São Paulo, Brasil) apresenta partículas de 120 mesh (0,125 mm) e é composta por 50,0 % de proteína, 21,0% de carboidrato e 2,3% de clorofila. Foi seca em estufa a 60 °C até peso constante (SOBRINHO *et al.*, 2015).



Figura 6. Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) *in natura*; b) cominuída à 288-312  $\mu$ m.

A MAR *Chlorella* sp. é subproduto de reação de síntese em que 100 g de MA *Chlorella* sp. seca foram misturadas a 300 mL do sistema de solventes clorofórmio:metanol 2:1 em balão de fundo redondo de 600 mL, extraídas durante 120 minutos à temperatura ambiente (20 °C), sob agitação magnética (700 rpm). A mistura foi filtrada e a fase orgânica evaporada sob pressão reduzida. Após a extração de lipídios, a reação foi realizada usando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalisador (3% em relação à massa lipídica), sob constante agitação, durante 4 horas a 60 °C. Concluída a reação, o excesso de metanol foi removido sob pressão reduzida e adicionou-se hexano. A mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner. O filtrado foi separado e o hexano foi removido sob pressão reduzida. Obteve-se, assim, a biomassa microalga *Chlorella* sp. residual (SOARES *et al.*, 2012).

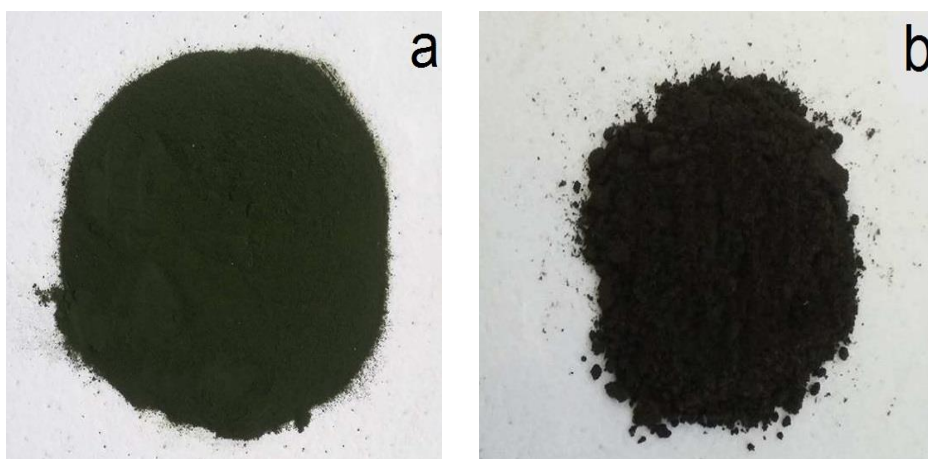


Figura 7. Amostras de MAs utilizadas nos processos: a) MA *Chlorella* sp. *in natura*; b) MA *Chlorella* sp. residual.

### 4.3 Hidrólise Alcalina da Biomassa

Em adição ao pré-tratamento físico, foi proposta a adição de etapa de ação química sobre as biomassas CA, MA e MAR, visando facilitar a posterior hidrólise ácida e, assim, incrementar a produção de monossacarídeos. A utilização de etapa hidrolítica alcalina em sistema aberto foi proposta como forma alternativa de atacar a fração de lignina das biomassas (LI *et al.*, 2015; TRAVAINI *et al.*, 2016).

O processo de hidrólise alcalina foi desenvolvido em chapa de aquecimento (IKA®, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil). O procedimento consistiu em atacar a fração de lignina das biomassas, na proporção de 10% v v<sup>-1</sup> do sistema, utilizando-se 5,0 g de biomassa previamente em adicionadas a béquer de 250 mL, acrescido de 50,0 mL de álcali diluído (NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH, CaCO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>OH), independentemente da natureza do álcali utilizado. O béquer foi mantido coberto com filme transparente de uso doméstico para evitar perdas, inclusive, no aquecimento com agitação (LI *et al.*, 2015; TRAVAINI *et al.*, 2016), conforme vê-se na Figura 8. Os experimentos foram executados em capela com exaustão.

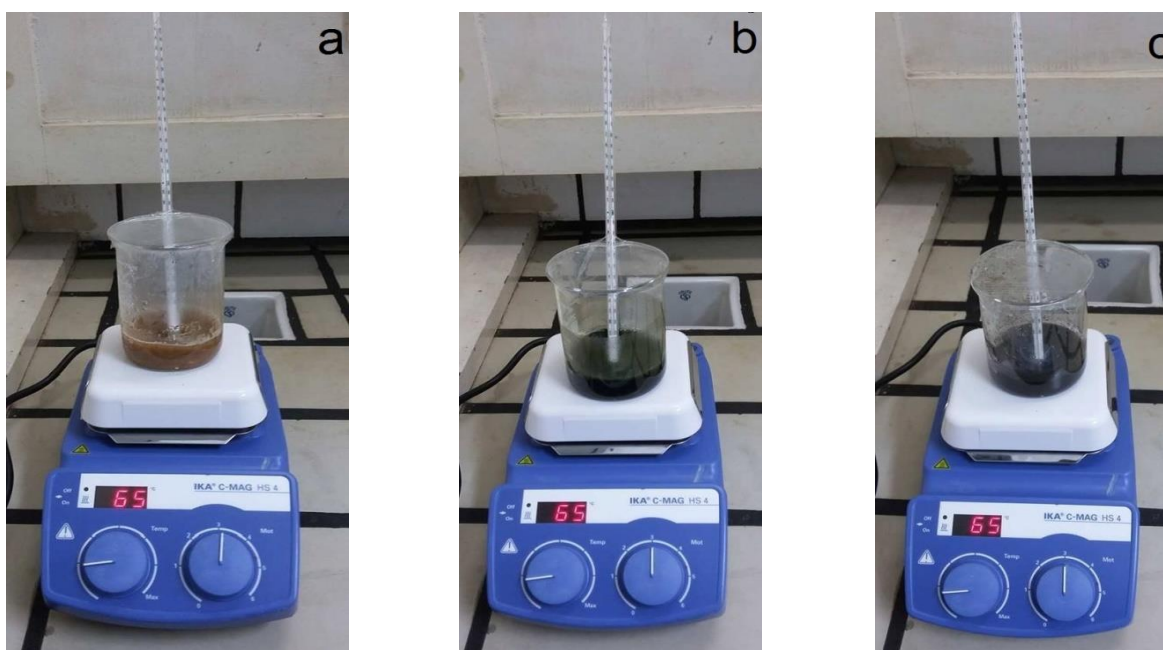


Figura 8. Processo de hidrólise alcalina em sistema aberto para: a) CA; b) MA *Chlorella* sp.; c) MA *Chlorella* sp. residual.

Para esta etapa, foram planejados experimentos multivariados envolvendo as principais variáveis de processo, visando-se obter a ampliação do montante final de monossacarídeos. O estudo explorou a temperatura (40 – 90 °C), tempo (10 – 60 min) e concentração de álcali (0,5 – 8,0 % m v<sup>-1</sup>). Para tanto, foram executados cinco planejamentos completos (um para cada álcali) – delineamento composto central rotacional (DCCR) – para as três variáveis independentes, com 8 combinações possíveis para os 2 níveis estudados (2<sup>3</sup>), acrescidas dos 6 ensaios axiais e outras 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos em cada planejamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a otimização do rendimento da glicose, xilose e arabinose nos processos de hidrólise alcalina das biomassas.

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
NaOH	Concentração (% m v <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	4,25	6,5	8,0
	Tempo (min)	10	20	35	50	60
	Temperatura (°C)	40	50	65	80	90
Ca(OH) <sub>2</sub>	Concentração (% m v <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	4,25	6,5	8,0
	Tempo (min)	10	20	35	50	60
	Temperatura (°C)	40	50	65	80	90
KOH	Concentração (% m v <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	4,25	6,5	8,0
	Tempo (min)	10	20	35	50	60
	Temperatura (°C)	40	50	65	80	90
CaCO <sub>3</sub>	Concentração (% m v <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	4,25	6,5	8,0
	Tempo (min)	10	20	35	50	60
	Temperatura (°C)	40	50	65	80	90
NH <sub>4</sub> OH	Concentração (% m v <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	4,25	6,5	8,0
	Tempo (min)	10	20	35	50	60
	Temperatura (°C)	40	50	65	80	90

Encerrado o processo, filtrou-se o hidrolisado e a biomassa foi lavada até pH neutro, para então ser seca em estufa a 60 °C por 24 h, e armazenada sob refrigeração a 4-8 °C, no escuro, até ser usada na hidrólise ácida à pressão.



#### 4.4 Hidrólise Ácida da Biomassa

O processo de hidrólise ácida à pressão foi feito em sistema de abertura de amostras Berghof (Berghof, Eningen, Alemanha). O procedimento básico consistiu em hidrolisar as biomassas, na proporção de 10% v v<sup>-1</sup> do sistema, utilizando-se 1,0 g de biomassa colocado em vaso de Teflon®TFM, com capacidade de 250 mL, acrescido de 10,0 mL de catalisador ácido diluído (PEDROSO *et al.*, 2017), independente da natureza do ácido utilizado (HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O recipiente, fechado hermeticamente, foi acondicionado em morteiro de aço inox e posicionado em sistema de aquecimento, conforme vê-se na Figura 9. Os experimentos foram executados sob exaustão.



Figura 9. Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida das biomassas. Componentes: (a) morteiro de aço inox; (b) sistema de aquecimento/resfriamento; (c) controlador de temperatura.

Terminado o processo, o sistema é resfriado com circulação de água e desmontado (sequência inversa à de montagem). As amostras são passadas em filtro qualitativo de celulose (45 µm) e armazenadas sob refrigeração a 4-8 °C, no escuro, para posterior análise dos produtos e subprodutos formados.

Esta etapa contou com a aplicação de planejamentos experimentais multivariados visando atingir maior liberação de monossacarídeos através do estudo dos efeitos de variáveis e suas interações no processo. Para a CA, os fatores

estudados foram: concentração de ácido (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,8 – 4,2% v v<sup>-1</sup>); tempo (28,0 – 62,0 min) e temperatura (128 – 162 °C), sendo que as pressões variaram de 34 (128 °C) bar a 48 (162 °C) bar. Já para as biomassas de MA, os fatores estudados foram: concentração de ácido (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 – 4,0% v v<sup>-1</sup>); tempo (36,6 – 53,4 min) e temperatura (150 – 174 °C), sendo que as pressões variaram de 40 (150 °C) a 52 (174 °C) bar (os parâmetros experimentais descritos foram definidos com base em PEDROSO *et al.*, 2017).

Foram executados dois planejamentos multivariados no formato DCCR, com três variáveis independentes, possuindo 8 combinações possíveis para os 2 níveis estudados (2<sup>3</sup>), acrescidas dos 6 ensaios axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos em cada planejamento (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a otimização do rendimento da glicose, xilose e arabinose, nos processos de hidrólise ácida da CA e MAs, em sistema Berghof.

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
CA	Concentração (% v v <sup>-1</sup> )	0,8	1,5	2,5	3,5	4,2
	Tempo (min)	28	35	45	55	62
	Temperatura (°C)	128	135	145	155	162
MA/MAR	Concentração (% v v <sup>-1</sup> )	0,5	1,5	2,5	3,5	4,0
	Tempo (min)	36,6	40	45	50	53,4
	Temperatura (°C)	150	155	162	169	174

#### 4.5 Destoxificação do Hidrolisado

A partir dos resultados do planejamento experimental do hidrolisado, selecionou-se o experimento que apresentou a melhor relação entre a liberação de monossacarídeos (para uso no processo fermentativo) e a menor quantidade de subprodutos inibidores.

Com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos provenientes da etapa hidrolítica, e que por natureza atuam como inibidores na fermentação, o hidrolisado foi submetido a processo de destoxificação, sem o qual, o meio não seria passível de uso como substrato fermentativo, dada a ocorrência de inibidores (MONTIPÓ *et*

*al.*, 2016; PEDROSO *et al.*, 2017). Para tal, o hidrolisado foi tratado com a adição de 4,0% (m v<sup>-1</sup>) de carvão ativo (Synth, Diadema, SP, Brasil), sendo incubado a 80 °C, por 1 h, centrifugado a 400 rpm (Centrífuga IKA, Staufen, Alemanha) (RAMBO *et al.*, 2013; PEDROSO *et al.*, 2017).

A seguir, a solução foi passada em filtro qualitativo de celulose (45 µm) e, após, filtrada a vácuo com membrana filtrante de nitrato de celulose (47 mm x 0,45 µm). O pH dos hidrolisados ácidos foi ajustado para o valor desejado (conforme planejamento de experimentos) com solução de NaOH 5,0 mol L<sup>-1</sup> (Peagâmetro PHTEC, Americana, SP, Brasil) e estocados sob refrigeração a 4-8 °C, no escuro, até a sua utilização.

#### **4.6 Avaliação da fermentabilidade dos Hidrolisados**

O microrganismo *Rhizobium radiobacter* LMG196 (bactéria Gram-negativa, naturalmente fixadora de nitrogênio em associação com plantas hospedeiras), empregado no experimento, foi procedente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). A cultura liofilizada foi reativada conforme metodologia pré-estabelecida (CCT, 2015) e, após, mantida e repicada em meio comercial caldo nutriente, previamente autoclavado, sendo incubado a 30 °C, por 24 h. O volume adotado para o inóculo foi definido em 10% do volume total de cultivo, sendo que a concentração celular adotada foi definida e padronizada pela leitura da absorbância do inóculo, no valor de 0,5 (λ=630 nm) em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu – UV 1800 (Quioto, Japão).

Os procedimentos com cultivo fermentativo foram feitos em escala de bancada visando-se reduzir custos, consumo de reagentes e materiais, bem como espaço físico. Para tanto, foram utilizados erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL de hidrolisado de cada biomassa. O volume de inóculo de 10% do volume total de cultivo foi definido em ensaios preliminares. O cultivo foi desenvolvido a 30 °C, em pH inicial 7,0, com acompanhamento em intervalos de 12 h (alíquotas de 100 µL), por um total de 120 h (Figura 10). Essas condições fazem parte de dados ainda não publicados do LATER e traduzem as condições ideais de cultivo da cepa *R. radiobacter* no hidrolisado de CA.



Figura 10. Processo fermentativo em escala de bancada.

#### 4.7 Método cromatográfico para a determinação de açúcares e subprodutos

A concentração dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) produzidos na hidrólise ácida das biomassas, bem como o consumo destes por *R. radiobacter* durante a etapa fermentativa, e ainda os subprodutos da fermentação, foram determinados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência assistida por detector de índice de refração (HPLC-RID). Foi utilizado equipamento cromatográfico Shimadzu (Tokio, Japão) equipado com desgaseificador DGU-20A5, bomba quaternária LC-20AT, controlador do sistema CBM-20A, amostrador automático SIL-20A, forno para coluna CTO-20A, detector de índice de refração RID-10A e software LCsolution (Figura 11).



Figura 11. Sistema cromatográfico Shimadzu (Tokio, Japão).

As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 4 e são resultado da otimização das condições analíticas, tais como a composição da fase móvel, sua vazão e a temperatura do sistema, visando adequada separação dos picos cromatográficos de cada analito. Para tanto, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10 v v<sup>-1</sup>) e passadas em filtro de seringa com membrana de politetrafluoretileno (PTFE 13 mm x 0,22 µm). Os filtros utilizados (contendo material particulado e frações de cultura bacteriana) foram autoclavados e descartados.

Tabela 4 – Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise e fermentação.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Coluna	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm – 9 µm partícula)
Temperatura	50 °C
Fase móvel	Água ultrapura contendo 5 mmol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Vazão	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Modo de Eluição	Isocrático
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	10,8 min (glicose), 11,6 min (xilose) e 12,8 min (arabinose), 16,8 min (ácido fórmico) e 18,3 min (ácido acético)

A fim de garantir a qualidade da informação analítica, avaliaram-se as figuras-de mérito envolvidas nas determinações analíticas, bem como a estabilidade das amostras (monitoramento três vezes por semana de amostras sob refrigeração e em temperatura ambiente).

#### **4.8 Gerenciamento de resíduos**

No decorrer das atividades e processos unitários do trabalho, os resíduos provenientes das etapas hidrolíticas foram armazenados para aproveitamento em trabalhos futuros (alvo de futuros esforços de pesquisa), enquanto os resíduos biológicos da etapa fermentativa foram previamente esterilizados (autoclavados) antes do seu descarte. Os resíduos químicos oriundos das análises cromatográficas, caracterizados pelos reagentes em geral e solventes orgânicos, foram segregados e

encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da UFSM, responsável pela destinação final via empresa nacional, autorizada.

Assim, foi reduzido o volume de resíduos gerados que demandaram cuidados de segregação para adequada destinação final. Mesmo a fase móvel, após otimização, não fez uso de solventes orgânicos, bastando para seu descarte a neutralização do pH.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinações analíticas

#### 5.1.1 Métodos cromatográficos

Fez-se uso de abordagens analíticas e quimiométricas nos procedimentos envolvendo as análises cromatográficas visando-se as melhores condições de análise. Esta sistemática foi desenvolvida antes da execução das análises de amostras dos processos hidrolíticos e fermentativos. Para assegurar a qualidade da informação analítica gerada ao longo deste trabalho, foram avaliados a faixa linear da curva de calibração do método, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), bem como os limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) para cada um dos analitos estudados nas respectivas amostras.

O LD foi calculado como o menor nível de concentração no qual os compostos estudados foram identificados com uma razão sinal/ruído (S/N) > 3,0. O LQ foi definido como o menor nível de concentração em que o composto apresentou razão S/N > 10, com auxílio de soluções padrão (INMETRO, 2017).

#### 5.1.2 Estabilidade das amostras

A avaliação da estabilidade das amostras foi feita através do método de determinação por HPLC-RID, com utilização de soluções-padrão. Para isso, 3 soluções idênticas de 250,0 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas, sendo colocadas sob refrigeração (I); sob refrigeração na ausência de luz (com o frasco âmbar revestido com folha de alumínio) (II); e sobre a bancada de trabalho (III). Foi constatado que, em até 25 dias, não houve diferença detectável para glicose e xilose (desvio < 5%), enquanto que, para arabinose e os ácidos fórmico e acético, em 10 dias, já se podia identificar diferenças em relação à concentração inicial, acima de 10%.

Comparando-se as condições utilizadas para a avaliação de estabilidade (ausência de refrigeração, bem como exposição à luz), percebe-se que nenhuma delas se mostrou relevante, ou seja, não exercem influência sobre a estabilidade das amostras, indicando que o preparo dos padrões e soluções-padrão secundários

deve ocorrer imediatamente antes de sua utilização, visto não ser possível o estoque por período prolongado.

### 5.1.3 Determinação com HPLC-RID

O método de determinação dos açúcares por HPLC-RID foi desenvolvido com o auxílio de soluções-padrão (seção 4.7). As figuras-de-mérito obtidas para os açúcares e para os subprodutos estão expostas na Tabela 5. Os  $r^2$  obtidos para as curvas de calibração, na faixa linear de trabalho, evidenciam linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação dos analitos. A Figura 12 mostra cromatogramas das análises de soluções-padrão dos açúcares glicose, xilose e arabinose, e dos subprodutos ácido fórmico e acético ( $\text{g L}^{-1}$ ) via HPLC-RID, e ainda das análises das alíquotas do processo fermentativo, que ilustram o consumo dos açúcares.

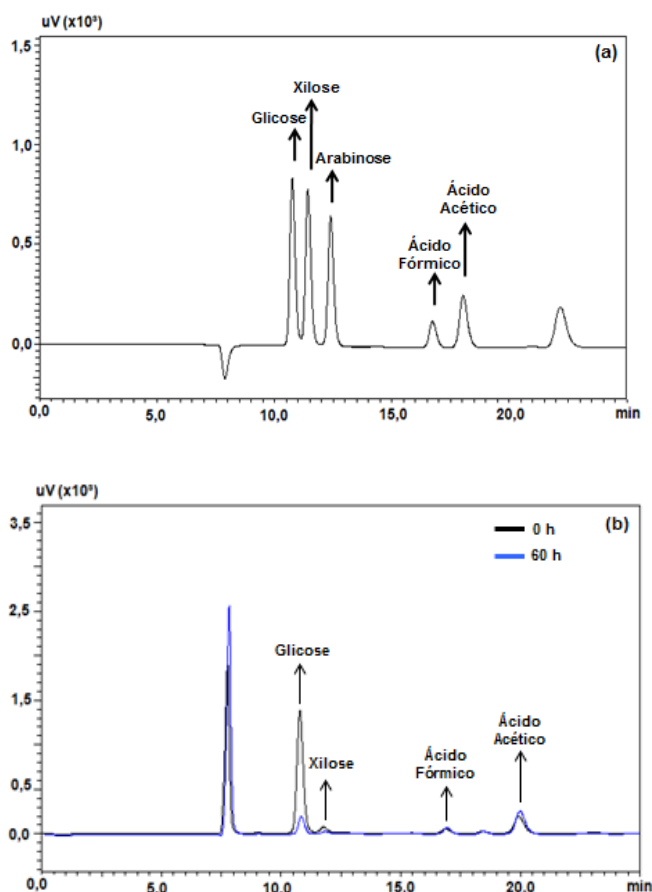


Figura 12. Cromatogramas obtidos a partir da injeção de (a) soluções-padrão ( $\text{g L}^{-1}$ ), e subprodutos ácido fórmico e acético; e (b) amostra do monitoramento da fermentação com consumo dos açúcares.



O modelo de regressão linear mostrou-se adequado para as determinações analíticas, uma vez que os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 para todos os analitos. O INMETRO recomenda que o  $r^2$  seja igual ou superior a 0,90 (INMETRO, 2017). Os LQs foram adequados para a quantificação dos analitos e acompanhamento do bioprocessamento. Os limites do método são os mesmos do instrumento para os analitos em estudo, uma vez que não há etapas de preparo e pré-concentração das amostras (apenas diluição e filtração com filtro de seringa 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Tabela 5 – Figuras-de-mérito da determinação dos analitos e subprodutos.

Analitos	Equação da reta	Faixa linear ( $\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$	LD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	LQ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Glicose	$y = 322,15x + 1646,41$	0,25 – 2,0	0,999	7,5	25,0
Xilose	$y = 312,35x - 152,25$	0,25 – 2,0	0,999	7,5	25,0
Arabnose	$y = 324,30x - 704,10$	0,25 – 2,0	0,998	7,5	25,0
Ácido fórmico	$y = 99,79x - 1707,91$	0,5 – 1,0	0,999	16,5	55,0
Ácido acético	$y = 128,54x - 1642,79$	0,5 – 1,0	0,999	16,5	55,0

A faixa linear revelou-se apropriada às necessidades do estudo, visto que as concentrações das amostras analisadas, após filtração e diluição, concentram-se na região linear da curva de calibração. Dessa forma, a metodologia de determinação por HPLC-RID atende à demanda analítica e fornece informação qualificada.

## 5.2 Hidrólise alcalina das biomassas

### 5.2.1 Otimização da hidrólise alcalina

Conforme descrito na seção 4.3, esta etapa foi proposta como forma alternativa de ataque à porção recalcitrante, sobretudo, à lignina das biomassas, facilitando assim a posterior hidrólise ácida e, com isso, aumentando o rendimento em monossacarídeos.

Para o processo de hidrólise alcalina em sistema aberto, foram desenvolvidas estratégias de planejamento multivariado que pudessem ser aplicados ao estudo

das variáveis do processo, e que envolvessem um número reduzido de medidas sem deixar de analisar um amplo espaço amostral. Isso foi feito para hidróxido de sódio, cálcio, potássio, amônio e carbonato de cálcio. Não somente a influência das variáveis foi analisada, como também o sinergismo entre tais variáveis independentes do processo e suas influências na produção de glicose, xilose e arabinose. Os fatores analisados nas hidrólises alcalinas, conforme descrito na seção 4.3, foram: concentração de álcali (0,5 – 8,0% m v<sup>-1</sup>), tempo (10,0 – 60,0 min) e temperatura (40 – 90 °C).

#### 5.2.1.1 Hidrólises alcalinas da casca de arroz

Como referência para os resultados obtidos usou-se uma condição já otimizada para a CA contendo 2,5% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hidrolisada a 162 °C por 45 min, cujas produtividades, em termos de monossacarídeos, são de 12,8 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1,2 g L<sup>-1</sup> de xilose e 0,4 g L<sup>-1</sup> de arabinose, com rendimentos de 128,0 , 12,0 e 4,0 mg g<sup>-1</sup> CA, respectivamente.

Nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 encontram-se os valores codificados dos ensaios de cada álcali e os respectivos resultados, sendo que os valores foram determinados por HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 6, as concentrações de glicose variaram de 12,7 a 19,3 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 127,0 a 193,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 1,7 a 3,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 17,0 a 30,0 mg xilose g<sup>-1</sup> CA; e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,4 a 0,8 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 4,0 a 8,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA – para NaOH. Os resultados demonstram a influência das variáveis independentes na resposta final. A exigência dos três pontos centrais para a resposta desejada é definida pela obtenção da informação acerca da reprodutibilidade (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

O experimento 1 da Tabela 6, empregando 2,0% (m v<sup>-1</sup>) de NaOH, 50°C e 20 min, demonstra que tais condições são muito brandas, sendo assim ineficazes no ataque à lignina da matriz e, por isso, geraram apenas 15,5 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando rendimento de 155,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA.

Tabela 6 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com NaOH, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	NaOH (% m v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	NaOH					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	12,7	127,0	2,2	22,0	0,6	6,0
2	1	-1	-1	16,7	167,0	3,0	30,0	0,6	6,0
3	-1	1	-1	15,5	155,0	2,5	25,0	0,7	7,0
4	1	1	-1	17,7	177,0	1,7	17,0	0,5	5,0
5	-1	-1	1	16,6	166,0	2,5	25,0	0,8	8,0
6	1	-1	1	17,5	175,0	2,8	28,0	0,8	8,0
7	-1	1	1	17,9	179,0	2,3	23,0	0,7	7,0
8	1	1	1	17,0	170,0	2,4	24,0	0,7	7,0
9	-1,68	0	0	14,6	146,0	2,2	22,0	0,5	5,0
10	1,68	0	0	17,3	173,0	1,7	17,0	0,4	4,0
11	0	-1,68	0	15,4	154,0	2,2	22,0	0,5	5,0
12	0	1,68	0	16,3	163,0	2,3	23,0	0,6	0,6
13	0	0	-1,68	16,5	165,0	2,1	21,0	0,6	0,6
14	0	0	1,68	18,0	180,0	2,0	20,0	0,4	4,0
15	0	0	0	16,9	169,0	2,4	24,0	0,6	6,0
16	0	0	0	19,3	193,0	1,9	19,0	0,5	5,0
17	0	0	0	17,5	175,0	2,2	22,0	0,5	5,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão (glicose) = ± 1,27 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,25 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (arabinose) = ± 0,08 (g L<sup>-1</sup>).

Da mesma forma, de acordo com a Tabela 7, para o planejamento com Ca(OH)<sub>2</sub>, as concentrações de glicose variaram de 8,2 a 13,4 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 82,0 a 134,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 0,9 a 4,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 9,0 a 40,0 mg xilose g<sup>-1</sup> CA e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,4 a 1,4 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 4,0 a 14,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA.

Assim como para o NaOH, o experimento 1 da Tabela 7, empregando 2,0% (m v<sup>-1</sup>) de Ca(OH)<sub>2</sub>, 50°C e 20 min mostra que tais condições são demasiadamente brandas, e por isso geraram apenas 12,6 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 126,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA quando o álcali Ca(OH)<sub>2</sub> é usado. Já o experimento 8 da Tabela 7, fazendo-se uso de 6,5% (m v<sup>-1</sup>) de Ca(OH)<sub>2</sub>, 80°C e 50 min mostrou que tais condições são muito severas, gerando

apenas 13,6 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 136,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA.

Tabela 7 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com Ca(OH)<sub>2</sub>, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	Ca(OH) <sub>2</sub> (% m v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	Ca(OH) <sub>2</sub>					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	10,9	109,0	1,3	13,0	0,4	4,0
2	1	-1	-1	10,6	106,0	2,4	24,0	0,7	7,0
3	-1	1	-1	13,4	134,0	1,5	15,0	0,5	5,0
4	1	1	-1	10,4	104,0	1,8	18,0	0,5	5,0
5	-1	-1	1	11,8	118,0	0,9	9,0	0,4	4,0
6	1	-1	1	10,0	100,0	2,2	22,0	0,6	6,0
7	-1	1	1	11,4	114,0	1,4	14,0	0,4	4,0
8	1	1	1	8,2	82,0	4,0	40,0	1,4	14,0
9	-1,68	0	0	11,9	119,0	1,7	17,0	0,6	6,0
10	1,68	0	0	11,1	111,0	2,3	23,0	0,6	6,0
11	0	-1,68	0	11,9	119,0	1,7	17,0	0,5	5,0
12	0	1,68	0	10,2	102,0	2,6	26,0	0,7	7,0
13	0	0	-1,68	11,9	119,0	1,6	16,0	0,5	5,0
14	0	0	1,68	10,1	101,0	2,1	21,0	0,6	6,0
15	0	0	0	11,4	114,0	2,7	27,0	1,3	13,0
16	0	0	0	8,5	85,0	3,7	37,0	1,3	13,0
17	0	0	0	9,5	9,5	3,1	31,0	1,1	11,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão (glicose) = ± 1,45 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,51 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (arabinose) = ± 0,08 (g L<sup>-1</sup>).

A Tabela 8 indica que as concentrações de glicose variaram de 8,3 a 20,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 83,0 a 200,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 1,8 a 5,4 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 18,0 a 54,0 mg xilose g<sup>-1</sup> CA e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,7 a 1,6 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 7,0 a 16,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA – para KOH.

Tabela 8 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com KOH, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	KOH (% m v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	KOH					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	13,0	130,0	3,2	32,0	1,1	11,0
2	1	-1	-1	8,3	83,0	5,4	54,0	1,6	16,0
3	-1	1	-1	11,8	118,0	4,4	44,0	1,5	15,0
4	1	1	-1	15,9	159,0	2,5	25,0	0,8	8,0
5	-1	-1	1	15,3	153,0	2,5	25,0	0,9	9,0
6	1	-1	1	16,6	166,0	4,0	40,0	1,2	12,0
7	-1	1	1	15,7	157,0	3,7	37,0	1,1	11,0
8	1	1	1	20,0	200,0	2,6	26,0	0,7	7,0
9	-1,68	0	0	9,5	95,0	3,0	30,0	1,0	10,0
10	1,68	0	0	17,4	174,0	2,0	20,0	0,7	7,0
11	0	-1,68	0	11,7	117,0	3,4	34,0	1,2	12,0
12	0	1,68	0	18,4	184,0	4,3	43,0	1,3	13,0
13	0	0	-1,68	12,4	124,0	2,7	27,0	1,0	10,0
14	0	0	1,68	14,9	149,0	2,7	27,0	1,1	11,0
15	0	0	0	14,6	146,0	3,6	36,0	0,9	9,0
16	0	0	0	15,7	157,0	3,3	33,0	1,0	10,0
17	0	0	0	16,6	166,0	1,8	18,0	0,8	8,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão (glicose) = ± 1,03 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,97 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (arabinose) = ± 0,08 (g L<sup>-1</sup>).

O experimento 9 da Tabela 8, empregando 0,5% (m v<sup>-1</sup>) de KOH, 65°C e 35 min demonstra que baixas concentrações do referido álcali são ineficazes (muito brandas) no ataque a lignina da matriz e por isso geraram apenas 13,5 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 135,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA.

De acordo com a Tabela 9, para o planejamento com CaCO<sub>3</sub>, as concentrações de glicose variaram de 9,3 a 14,1 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 93,0 a 141,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 2,0 a 3,4 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 20,0 a 34,0 mg xilose g<sup>-1</sup> CA e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,7 a 1,2 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 7,0 a 12,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA.

Tabela 9 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com CaCO<sub>3</sub>, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	CaCO <sub>3</sub> (% m v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	CaCO <sub>3</sub>					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	12,0	120,0	2,6	26,0	1,0	10,0
2	1	-1	-1	12,4	124,0	2,6	26,0	1,2	12,0
3	-1	1	-1	10,5	105,0	2,4	24,0	0,9	9,0
4	1	1	-1	12,0	120,0	2,5	25,0	1,1	11,0
5	-1	-1	1	10,7	107,0	2,2	22,0	1,0	10,0
6	1	-1	1	12,2	122,0	2,2	22,0	0,7	7,0
7	-1	1	1	11,2	112,0	2,3	23,0	1,0	10,0
8	1	1	1	11,5	115,0	2,6	26,0	1,1	11,0
9	-1,68	0	0	11,4	114,0	2,2	22,0	1,0	10,0
10	1,68	0	0	12,3	123,0	2,0	20,0	0,8	8,0
11	0	-1,68	0	14,1	141,0	2,8	28,0	1,1	11,0
12	0	1,68	0	12,2	122,0	2,4	24,0	1,0	10,0
13	0	0	-1,68	11,4	114,0	2,8	28,0	0,9	9,0
14	0	0	1,68	11,9	119,0	2,8	28,0	0,9	9,0
15	0	0	0	10,4	104,0	2,6	26,0	0,8	8,0
16	0	0	0	11,8	118,0	2,4	24,0	0,8	8,0
17	0	0	0	9,3	93,0	3,4	34,0	1,0	10,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA); Desvio padrão (glicose) = ± 1,23 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,53 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (arabinose) = ± 0,13 (g L<sup>-1</sup>).

O experimento 17 da Tabela 9, que corresponde ao ponto central do planejamento, empregando 4,25% (m v<sup>-1</sup>) de CaCO<sub>3</sub>, 65°C e 35 min mostrou que condições intermediárias são indesejáveis, gerando apenas 13,7 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 137,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA .

Da mesma forma, de acordo com a Tabela 10, as concentrações de glicose variaram de 11,8 a 16,4 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 118,0 a 164,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 0,0 a 3,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0,0 a 30,0 mg xilose g<sup>-1</sup> CA e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,1 a 1,2 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 1,0 a 12,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA - para NH<sub>4</sub>OH.

Tabela 10 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com NH<sub>4</sub>OH, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	NH <sub>4</sub> OH (% m v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	NH <sub>4</sub> OH					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	14,3	143,0	0,0	0,0	0,1	1,0
2	1	-1	-1	14,2	142,0	2,5	25,0	0,1	1,0
3	-1	1	-1	16,4	164,0	2,4	24,0	0,4	4,0
4	1	1	-1	13,3	133,0	1,8	18,0	1,1	11,0
5	-1	-1	1	11,8	118,0	3,0	30,0	0,1	1,0
6	1	-1	1	13,8	138,0	1,9	19,0	0,5	5,0
7	-1	1	1	13,8	138,0	2,3	23,0	0,5	5,0
8	1	1	1	13,4	134,0	1,1	11,0	0,2	2,0
9	-1,68	0	0	13,4	134,0	1,6	16,0	0,8	8,0
10	1,68	0	0	13,9	139,0	2,0	20,0	1,1	11,0
11	0	-1,68	0	13,9	139,0	1,6	16,0	0,8	8,0
12	0	1,68	0	13,6	136,0	2,2	22,0	1,0	10,0
13	0	0	-1,68	14,9	149,0	1,9	19,0	1,0	10,0
14	0	0	1,68	14,0	140,0	2,3	23,0	0,7	7,0
15	0	0	0	12,5	125,0	2,2	22,0	0,9	9,0
16	0	0	0	13,4	134,0	2,4	24,0	1,2	12,0
17	0	0	0	12,8	128,0	0,2	2,0	0,3	3,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão (glicose) = ± 0,41 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 1,20 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (arabinose) = ± 0,43 (g L<sup>-1</sup>).

Assim como para o CaCO<sub>3</sub>, o experimento 17 da Tabela 10, que corresponde ao ponto central do planejamento, empregando 4,25% (m v<sup>-1</sup>) de NH<sub>4</sub>OH, 65 °C e 35 min demonstra que condições intermediárias não são eficazes no ataque a lignina da matriz e por isso geram apenas 13,3 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 133,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA.

Na sequência, as matrizes contidas nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 foram processadas com auxílio do *software* Statistica 8.0 e os dados foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% (p<0,05).

A Tabela 11 mostra as equações que descrevem as concentrações de glicose, xilose e arabinose, para hidrólises com cada álcali, previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. Além de considerar os efeitos de cada variável, os modelos contemplam a interação entre elas. Algumas equações

não puderam ser previstas pelos modelos matemáticos, pois não apresentaram variáveis estatisticamente significativas.

Tabela 11 – Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise alcalina da CA.

Álcali	Fator resposta	Equação	Ajuste do modelo
NaOH	Glicose	$C_G = 17,87 + 1,54 [\text{NaOH}] + 1,31 (\text{temperatura}) - 1,33 (\text{tempo})^2 - 1,54 (\text{NaOH} \times \text{temperatura}) - 1,29 [\text{NaOH}]^2$	$r^2: 0,8884$
Ca(OH) <sub>2</sub>	Glicose	$C_G = 9,82 - 1,42 [\text{Ca(OH)}_2]$	$r^2: 0,7084$
Ca(OH) <sub>2</sub>	Xilose	$C_X = 3,15 + 0,93 [\text{Ca(OH)}_2] - 0,91 (\text{temperatura})^2 - 0,81 [\text{Ca(OH)}_2]^2$	$r^2: 0,8319$
Ca(OH) <sub>2</sub>	Arabinose	$C_A = 1,21 - 0,44 (\text{temperatura})^2 - 0,40 [\text{Ca(OH)}_2]^2 - 0,38 (\text{tempo})^2$	$r^2: 0,8507$
KOH	Glicose	$C_G = 15,58 + 3,32 (\text{temperatura}) + 3,12 (\text{tempo}) + 2,68 [\text{KOH}]$	$r^2: 0,8221$
KOH	Xilose	$C_X = 2,85 - 1,66 (\text{KOH} \times \text{tempo})$	$r^2: 0,6706$
KOH	Arabinose	$C_A = 0,87 - 0,46 (\text{KOH} \times \text{tempo}) + 0,28 (\text{tempo})^2$	$r^2: 0,8207$
CaCO <sub>3</sub>	Glicose	$C_G = 10,53 + 1,54 (\text{tempo})^2$	$r^2: 0,6385$
CaCO <sub>3</sub>	Xilose	$C_X = 2,83 - 0,53 [\text{CaCO}_3]^2$	$r^2: 0,5798$
NH <sub>4</sub> OH	Glicose	$C_G = 12,91 - 1,03 (\text{temperatura}) - 1,34 (\text{NH}_4\text{OH} \times \text{tempo}) + 1,03 (\text{temperatura})^2 + 1,15 (\text{NH}_4\text{OH} \times \text{temperatura})$	$r^2: 0,8643$

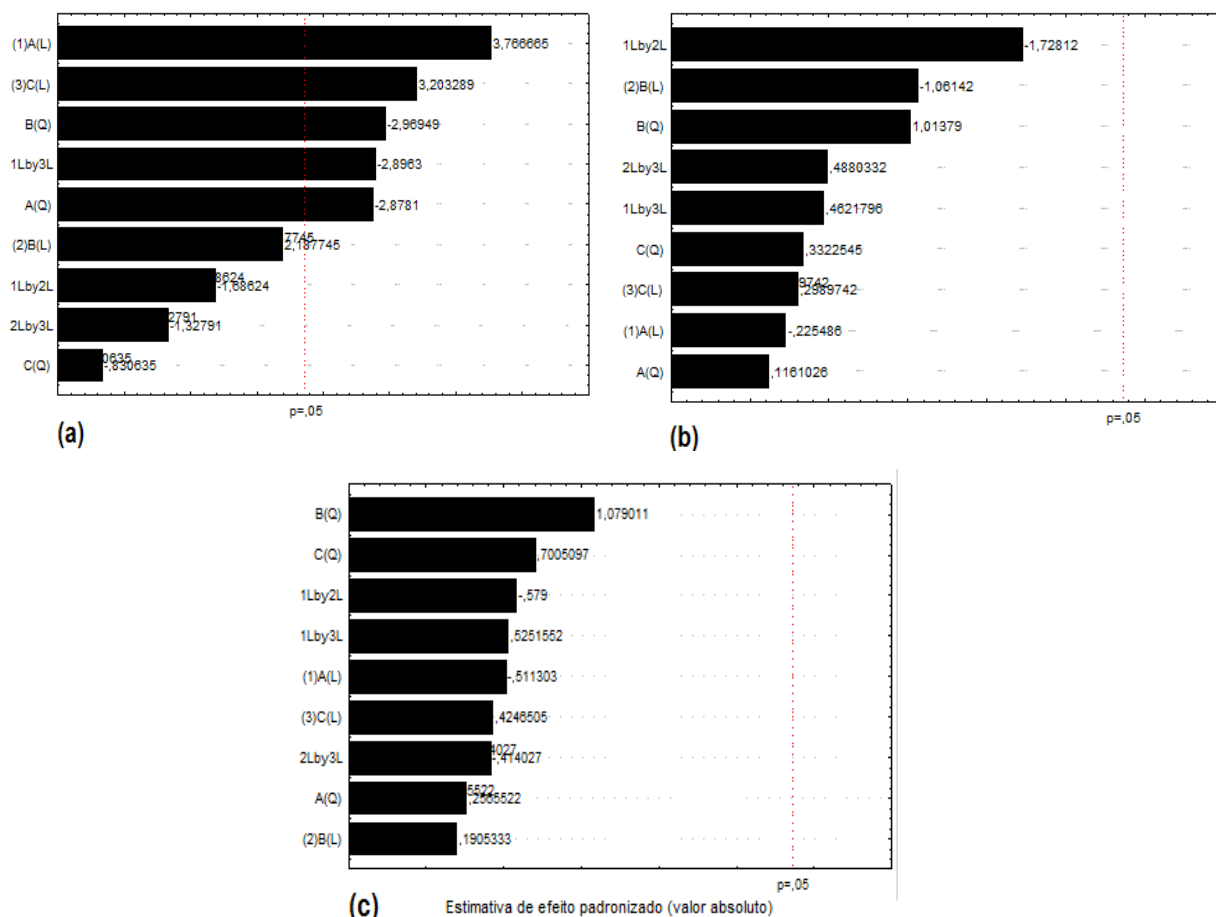
$C_G$  = Concentração glicose g L<sup>-1</sup>;  $C_X$  = Concentração xilose g L<sup>-1</sup>;  $C_A$  = Concentração arabinose g L<sup>-1</sup>.

Os dados resultantes dos ensaios, avaliados através dos diagramas de Pareto (para os cinco álcalis utilizados; Figuras 13, 14, 15, 16 e 17) demonstram os valores do teste *t* para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado, segundo matriz pré-concebida para os 17 ensaios experimentais, para as variáveis concentração do álcali (% m v<sup>-1</sup>), tempo (min) e temperatura (°C).

Para as hidrólises com NaOH, a produtividade de glicose se mostrou influenciada positivamente pela concentração do álcali e pela temperatura, de forma linear (i. é, são preferíveis condições de maior severidade), negativamente pelo tempo e concentração do álcali, no modelo quadrático, e, ainda, pela interação concentração do álcali x temperatura, também negativamente (Figura 13, a). O



diagramas de Pareto para as produtividades de xilose (Figura 13, b) e arabinose (Figura 13, c) indicam que nenhuma das variáveis e interações do modelo foi capaz de afetar o fator resposta (produção) de forma significativa.

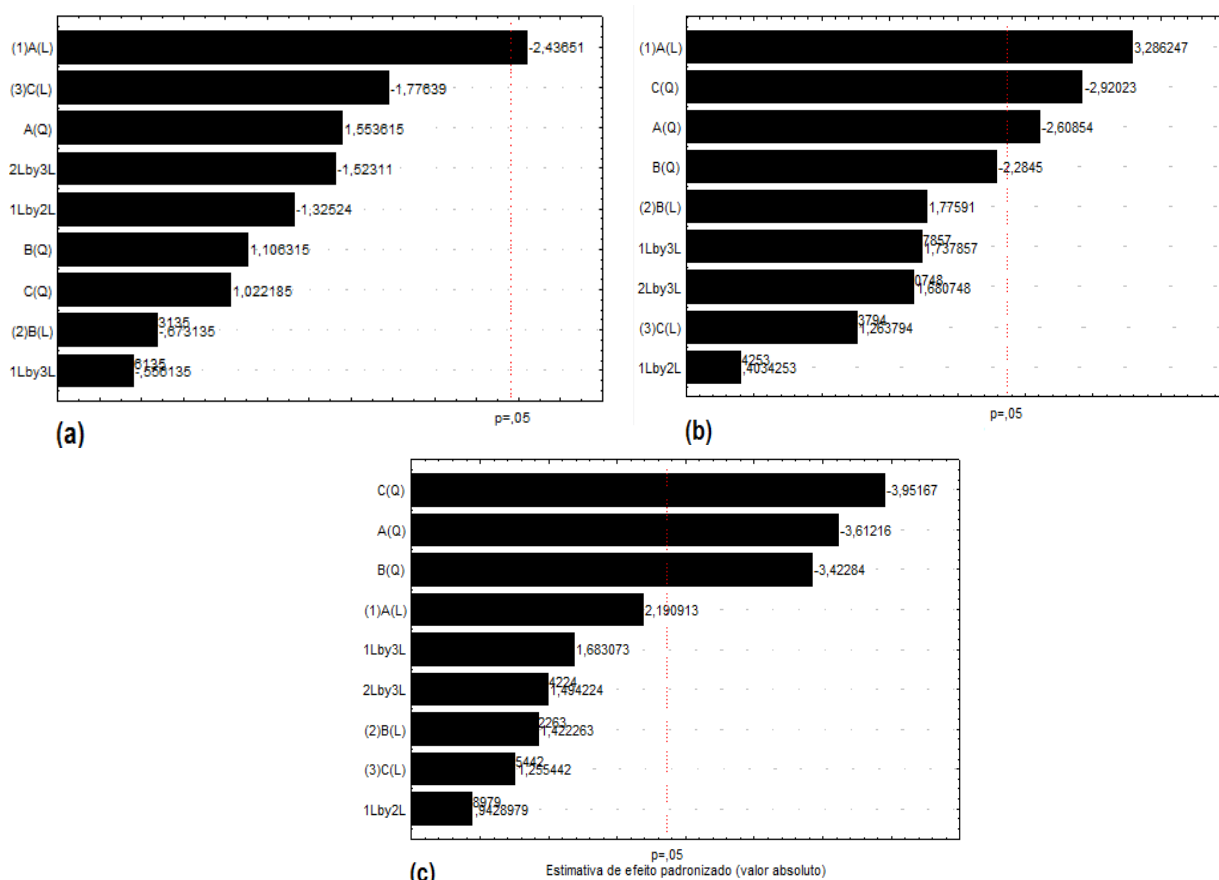


A: Concentração de de álcali (% m v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 13. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando-se NaOH, com os fatores-resposta para a liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises da CA.

A produção de glicose foi afetada, de forma linearmente negativa, apenas pela concentração de álcali (Figura 14, a). Quando se analisou a produção de xilose, a concentração de álcali influenciou de forma linear positiva, enquanto a temperatura e a concentração de álcali influenciaram de forma negativa (i. é, seriam preferíveis condições de menor severidade), no modelo quadrático (Figura 14, b). Ademais, a produtividade de arabinose foi influenciada negativamente pela concentração de

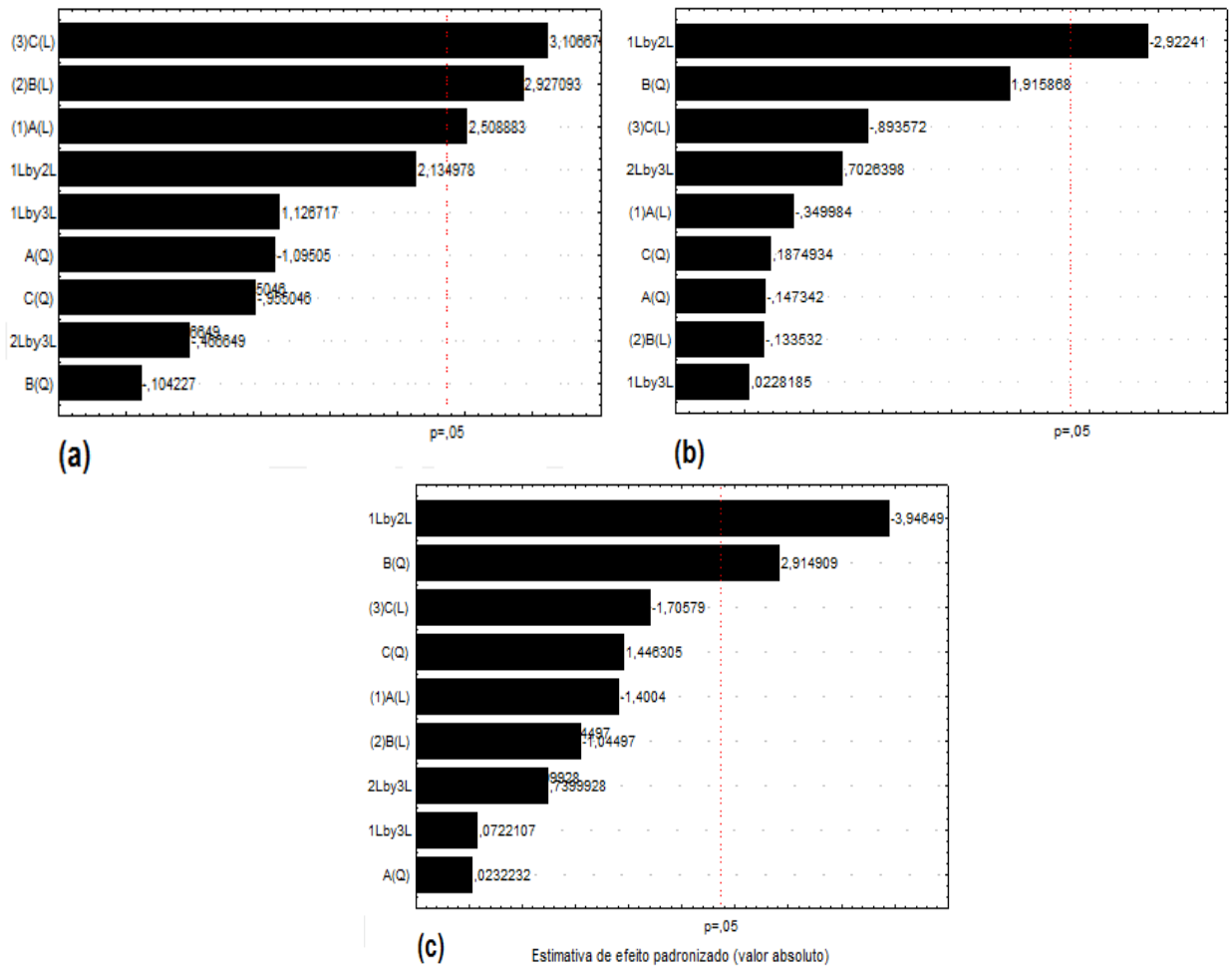
álcali, tempo e temperatura, no modelo quadrático (Figura 14, c) - para hidrólises com o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .



A: Concentração de de álcali ( $\% \text{ m v}^{-1}$ ); B: tempo (min); C: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); L: linear; Q: quadrático.

Figura 14. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.

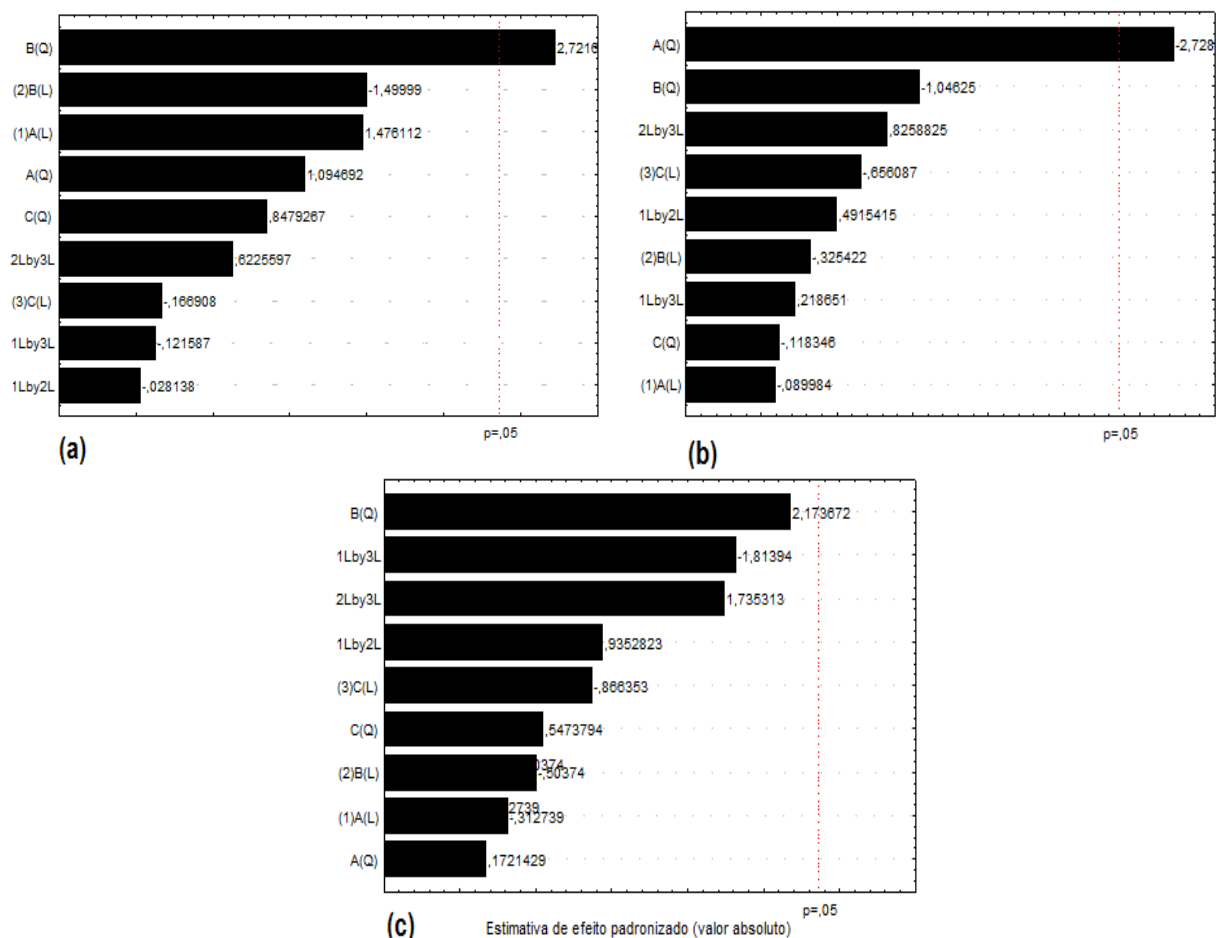
Para as hidrólises com o KOH, a produtividade de glicose se mostrou influenciada pela concentração de álcali, tempo e temperatura de forma linearmente positiva (i. é, maior severidade é desejável) (Figura 15, a). A produção de xilose foi afetada, negativamente, apenas pela interação concentração de álcali x tempo (Figura 15, b). E, quando se analisou a produção de arabinose, o diagrama de Pareto indicou que a interação concentração de álcali x tempo afetou de forma negativa, enquanto o tempo afetou positivamente, no modelo quadrático (Figura 15, c).



A: Concentração de de álcali (% m v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 15. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando KOH, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.

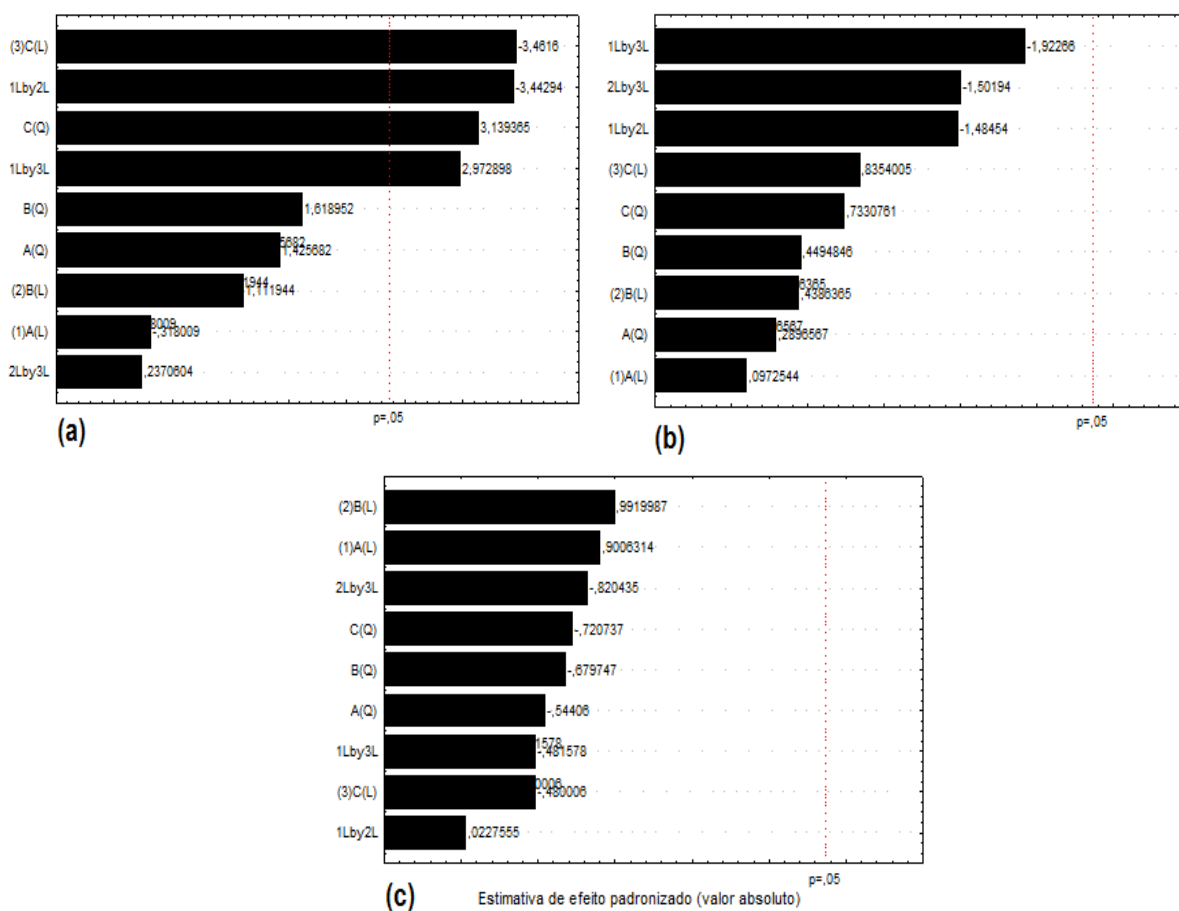
Como descrito pela Figura 16, apenas o tempo afetou a produção de glicose positivamente, no modelo quadrático (Figura 16, a). Quando se analisou a produção de xilose, apenas a concentração de álcali influenciou negativamente, no modelo quadrático (Figura 16, b). Ademais, o diagrama de Pareto para a produtividade de arabinose (Figura 16, c), indica que nenhuma das variáveis e interações do modelo foi capaz de afetar o fator resposta (produção de arabinose) de forma significativa - para as hidrólises com o CaCO<sub>3</sub>.



A: Concentração de de álcali (% m v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 16. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando CaCO<sub>3</sub>, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.

Para as hidrólises com NH<sub>4</sub>OH, a produtividade de glicose se mostrou influenciada de forma linearmente negativa pela temperatura e pela interação concentração de álcali x tempo (i. é, ao contrário dos outros álcalis, com NH<sub>4</sub>OH, a severidade elevada prejudica a liberação de glicose); e positivamente, pela interação temperatura x concentração de álcali e pela temperatura, no modelo quadrático (Figura 17, a). O diagramas de Pareto para as produtividades de xilose (Figura 17, b) e arabinose (Figura 17, c) indicam que nenhuma das variáveis e interações do modelo foi capaz de afetar o fator resposta (produção) de forma significativa.



A: Concentração de de álcali (% m v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 17. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando NH<sub>4</sub>OH, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.

As representações gráficas das respostas, dispostas na Figura 18, relativas às investigações da produção de glicose, xilose e arabinose, auxiliam na visualização dos resultados das hidrólises alcalinas da CA.

Para as hidrólises com NaOH, de forma sucinta, é possível constatar que as melhores condições estão na região do ponto central, conforme o experimento 16 da Tabela 6, que gerou 21,7 g L<sup>-1</sup>. Contudo, a superfície de contorno indica que condições que apresentam 6,5% (m v<sup>-1</sup>) de álcali (+1), 35 min (0) e 80 °C (+1) podem levar às melhores produtividades, ou seja, se situam na região experimental ótima. Chegando a esta conclusão a partir do modelo, conclui-se que o mesmo é capaz de descrever o processo e obter-se a condição otimizada (Figura 18, a), ao compreender a influência de cada variável, identificando o ponto de maior

produtividade. Experimentos confirmatórios devem ser feitos a fim de garantir a informação descrita pelo modelo estatístico, gerando, provavelmente, rendimento ainda superior ao obtido no ponto central do planejamento.

Para o processo com  $\text{Ca(OH)}_2$ , regiões com relativas baixa concentração ácida, baixa temperatura e tempos intermediários de hidrólise geraram os melhores rendimentos, como no experimento 3 da Tabela 7, em que se obteve  $15,5 \text{ g L}^{-1}$ . Todavia, tomando-se como base a superfície de contorno (Figura 18, b), a condição otimizada se encontra em processos com menor severidade, ou seja, temperatura abaixo de  $40^\circ\text{C}$  (-1,68), tempos de até 10 minutos (-1,68) e concentrações alcalinas inferiores a  $0,5\%$  ( $\text{m v}^{-1}$ ) (-1,68). Assim, para comprovar esta região experimental como a melhor condição para este processo, novos experimentos são necessários, e podem resultar em produtividades superiores àquela obtida no experimento 3.

Para as hidrólises com  $\text{KOH}$ , os rendimentos mais altos foram obtidos com uso de concentrações do álcali e temperaturas intermediárias e tempos mais elevados, conforme o experimento 12 da Tabela 8, que apresentou concentração de açúcares liberados de  $24,0 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo, de acordo com a superfície de contorno (Figura 18, c), se elevarmos a concentração do álcali para  $6,5\%$  ( $\text{m v}^{-1}$ ) (+1), e a temperatura para  $80^\circ\text{C}$  (+1), podemos esperar um aumento ainda maior no rendimento, pois as condições experimentais estarão no centro da região ótima. Assim, ainda que o rendimento de  $24 \text{ g L}^{-1}$  já seja elevado, há potencial para obtenção de valores ainda mais altos.

Para o processo com  $\text{CaCO}_3$ , hidrólises com tempos menores e concentrações do álcali e temperaturas intermediárias compõem as melhores condições experimentais, como é indicado pelo experimento 11 da Tabela 9, que gerou  $18,0 \text{ g L}^{-1}$ . A superfície de contorno mostra que a região experimental do planejamento não corresponde às condições ideais de hidrólise. Assim, a superfície indica que tempos menores ( $<10 \text{ min}$ ) são mais desejáveis para o aumento da produtividade de açúcares e mostra que concentrações maiores que  $4,25\%$  ( $\text{m v}^{-1}$ ) de álcali (ponto central) podem também contribuir para esse aumento de produtividade (Figura 18, d). A exploração dessa nova região pode resultar em rendimentos maiores.

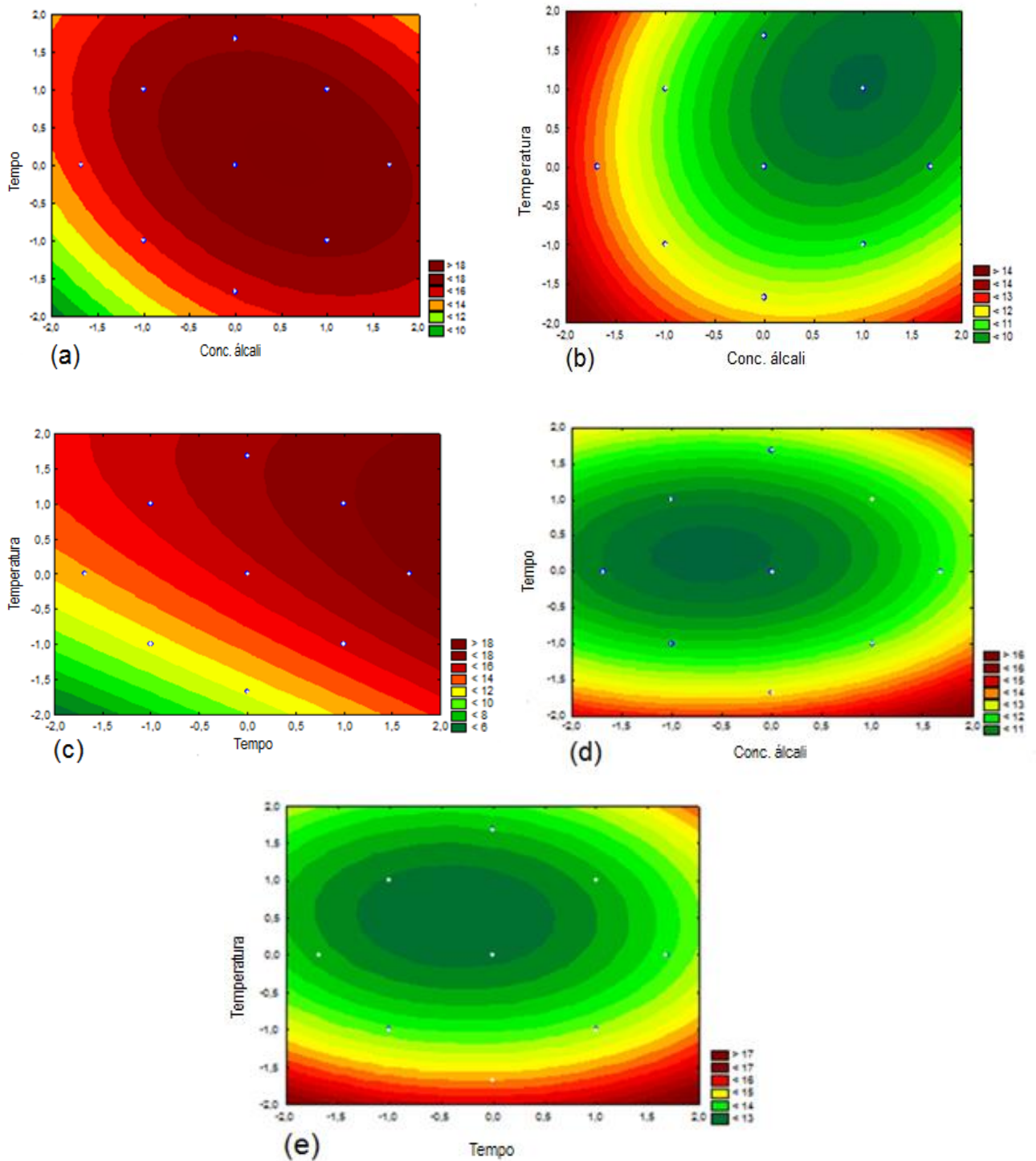


Figura 18. Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da CA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) com a) NaOH; b)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; c) KOH; d)  $\text{CaCO}_3$ ; e)  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Para as hidrólises com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , as condições que apresentam os rendimentos mais elevados estão na região de menor concentração alcalina e temperatura com tempos intermediários, como no experimento 3 da Tabela 10, que liberou  $19,2 \text{ g L}^{-1}$ .

A superfície de contorno mostra que a região experimental do planejamento não corresponde às condições ideais de hidrólise. Ademais, tendo como base a superfície de contorno (Figura 18, e), a condição otimizada se encontra em processos com temperatura abaixo de 40°C (-1,68) e tempos localizados nos pontos axiais (extremos). Experimentos nessa região podem elevar os rendimentos.

Em posse dos dados e da avaliação estatística, é possível comparar-se os rendimentos obtidos para cada álcali. Os processos que utilizaram os hidróxidos de amônio (maior rendimento 19,2 g L<sup>-1</sup>), sódio (maior rendimento 21,7 g L<sup>-1</sup>) e potássio (maior rendimento 24,0 g L<sup>-1</sup>), após otimização, atingiram produtividades consideráveis — traçando-se um paralelo com a condição de referência previamente descrita (processo de hidrólise da CA sem emprego da etapa alcalina, resultando em 14,4 g L<sup>-1</sup>). Assim, há um ganho de produtividade de 33,3% de açúcares liberados quando se emprega NH<sub>4</sub>OH, 50,7% quando se emprega NaOH, e 66,6% quando utilizado KOH.

A obtenção de rendimentos mais elevados se deve, provavelmente, ao ataque eficiente desses álcalis à matriz lignocelulósica. Como a fração mais externa dessa matriz, a lignina, é quem confere grande parte da cristalinidade, o uso desses tratamentos alcalinos solubilizam esta fração e tornam mais acessíveis tanto a celulose quanto a hemicelulose (SILVEIRA *et al.*, 2015; KIM, LEE & KIM, 2016). Uma vez expostas (celulose e hemicelulose) ao tratamento ácido subsequente, é razoável esperar que os rendimentos da etapa hidrolítica ácida sejam superiores.

Por outro lado, os processos de hidrólise empregando hidróxido de cálcio (maior rendimento 15,5 g L<sup>-1</sup>) e carbonato de cálcio (maior rendimento 18,0 g L<sup>-1</sup>), resultaram em rendimentos menores, pouco acima dos valores obtidos na condição de referência; aumento de 7,6% na liberação de açúcares com CA(OH)<sub>2</sub> e aumento de 25,0% com CaCO<sub>3</sub>. Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito do álcali em solução, que parece ser menos apto em atacar a matriz da CA. Embora os valores desses álcalis tenham permitido sua avaliação, ao considerar-se o pequeno ganho em produtividade, é preciso optar-se por rever as condições experimentais com vistas a uma melhor otimização, que proporcione rendimentos de açúcares ainda mais elevados, ou considerar que ambos não são adequados ao pré-tratamento proposto.



Esses resultados precisam, ainda, ser comparados com trabalhos da literatura a fim de definir se essas concentrações são significativas. KIM *et al.* (2016), estudando o emprego de NaOH sobre materiais lignocelulósicos, relata deslignificações de até 80% em condições de até 10% m v<sup>-1</sup> NaOH, 60 a 180 °C e até 60 min, resultando em até 50% da fração de hemicelulose disponível para a conversão em açúcares. Esses valores condizem com o rendimento deste trabalho, corroborando a utilidade da etapa alcalina.

Já KASSIM & BHATTACHARYA (2015), avaliando MA *Chlorella* sp. empregou KOH (2% m v<sup>-1</sup>, 120°C, 30 min) e NaOH (2% m v<sup>-1</sup>, 120 °C, 120 min), obtendo 8,1 g L<sup>-1</sup> e 8,8 g L<sup>-1</sup> de açúcares, respectivamente. Embora a hidrólise alcalina da MA e MAR não tenha sido concluída, os resultados deste trabalho, a partir da CA, foram superiores aos mencionados, já que foi obtido acima de 20 g açúcares L<sup>-1</sup>.

#### 5.2.1.2 Hidrólises alcalinas da microalga

Nos estudos prévios, não foi possível completar o processo de hidrólise alcalina em sistema aberto com as biomassas de MA devido a dificuldades enfrentadas no decorrer das etapas unitárias do processo, tais como pesagem da biomassa (material pouco denso e higroscópico), neutralização e filtração do sistema, tanto à vácuo quanto com filtro de seringa, após a hidrólise e maceração da biomassa seca. Meios para superação destas dificuldades devem ser buscados, visando dar continuidade ao processo hidrolítico dessas biomassas, possibilitando seu estudo e avaliação adequados.

### 5.3 Hidrólise ácida das biomassas

#### 5.3.1 Otimização da hidrólise ácida

Para o processo de hidrólise ácida à pressão, foram desenvolvidas estratégias de planejamento multivariado que pudessem ser aplicados ao estudo das variáveis do processo, e que envolvessem um número reduzido de medidas sem deixar de analisar um amplo espaço amostral. Isso foi feito para o ácido clorídrico e ácido sulfúrico. Não somente a influência das variáveis analisada, como

também o sinergismo entre tais variáveis independentes do processo e suas influências na produção de glicose, xilose e arabinose.

Os fatores analisados nas hidrólises ácidas diluídas, conforme descrito na seção 4.4, foram: concentração de ácido (0,8 – 4,2% v v<sup>-1</sup>), tempo (28,0 – 62,0 min) e temperatura (128 – 162 °C) – para a CA; e concentração de ácido (0,5 – 4,0% v v<sup>-1</sup>), tempo (36,6 – 53,4 min) e temperatura (150 – 174 °C) – para as MAs. Essas condições tomaram por base estudos prévios, bem como referencial de artigos tratando de processos hidrolíticos de biomassas (ALVIRA *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2013; PEDROSO *et al.*, 2017).

#### 5.3.1.1 Hidrólises ácidas da casca de arroz

Nas Tabelas 12 e 13 encontram-se os valores codificados dos ensaios de cada ácido e os respectivos resultados, sendo que os valores foram determinados por HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 12, as concentrações de glicose variaram de 1,2 a 12,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 12,3 a 120,0 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 0,0 a 14,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0,0 a 140,1 mg xilose g<sup>-1</sup> CA; e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,2 a 2,5 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 1,6 a 24,7 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA - para HCl. Os resultados demonstram a influência das variáveis independentes na resposta final. A exigência dos três pontos centrais para a resposta desejada é definida pela obtenção da informação acerca da reprodutibilidade (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

O experimento 8 da Tabela 12, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 155 °C e 55 min, demonstra que concentrações elevadas do referido ácido são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis (sobretudo xilose) e, por isso gerou apenas 10,4 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 104 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA. Com uma liberação de açúcares de 11,1 g L<sup>-1</sup>, indicando um rendimento de 111 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA, o experimento 12 da Tabela 12, usando 2,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 145 °C e 62 min, mostrou que tempos de hidrólise mais elevados não são adequados para a obtenção dos maiores rendimentos de açúcares.

Tabela 12 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	HCl (% v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	HCl					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	1,7	16,9	13,5	135,3	1,7	17,0
2	1	-1	-1	1,5	14,8	11,8	117,6	1,3	13,4
3	-1	1	-1	2,1	20,9	14,0	140,1	1,7	17,5
4	1	1	-1	10,1	100,5	1,6	15,6	0,6	6,2
5	-1	-1	1	6,8	68,0	4,4	43,9	1,0	10,3
6	1	-1	1	9,7	97,4	0,9	9,0	0,5	4,9
7	-1	1	1	3,1	31,0	10,7	107,1	1,6	16,3
8	1	1	1	10,2	102,3	0	0	0,2	1,6
9	-1,68	0	0	2,3	22,6	13,2	131,7	1,7	17,1
10	1,68	0	0	4,9	48,7	4,9	48,7	1,1	11,0
11	0	-1,68	0	2,9	29,3	10,6	106,1	1,4	14,3
12	0	1,68	0	5,9	59,1	4,2	42,4	1,0	10,2
13	0	0	-1,68	1,2	12,3	11,6	116,5	2,5	24,7
14	0	0	1,68	12,0	120,0	0,5	5,0	0,3	3,0
15	0	0	0	4,4	44,4	8,4	83,6	2,1	20,8
16	0	0	0	3,4	33,9	10,3	102,7	1,6	15,6
17	0	0	0	4,6	45,7	9,5	95,4	1,7	17,2

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão = ± 0,30 (g L<sup>-1</sup>).

Da mesma forma, de acordo com a Tabela 13, para o planejamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as concentrações de glicose variaram de 1,2 a 11,9 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 12,4 a 119,1 mg glicose g<sup>-1</sup> CA; as concentrações de xilose variaram de 1,2 a 13,6 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 11,7 a 136,1 mg xilose g<sup>-1</sup> CA; e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,4 a 2,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 4,5 a 20,0 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA.

O experimento 10 da Tabela 13, empregando 4,2% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 145°C e 45 min, obteve os piores resultados (11,8 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 118,0 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA) dentro do planejamento executado, o que indica que concentrações elevadas do referido ácido são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis.

Tabela 13 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com CA.

Ensaio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>	C <sub>Arabinose</sub>	R <sub>Arabinose</sub>
1	-1	-1	-1	1,2	12,4	11,0	109,6	1,3	13,4
2	1	-1	-1	2,0	20,1	11,6	115,8	2,0	20,0
3	-1	1	-1	1,4	13,8	12,5	125,1	1,6	16,1
4	1	1	-1	1,7	17,2	13,6	136,1	1,7	17,1
5	-1	-1	1	4,6	46,5	7,5	75,4	1,2	12,4
6	1	-1	1	8,2	82,5	4,2	41,7	1,0	10,1
7	-1	1	1	7,2	72,0	4,0	40,2	0,9	8,6
8	1	1	1	11,9	119,1	1,2	11,7	0,4	4,5
9	-1,68	0	0	2,0	19,7	11,7	117,3	1,4	14,2
10	1,68	0	0	5,9	59,3	4,8	48,1	1,0	10,4
11	0	-1,68	0	2,3	23,3	11,3	112,7	1,6	15,6
12	0	1,68	0	3,6	35,9	8,7	87,2	1,3	13,4
13	0	0	-1,68	1,7	17,3	11,0	110,3	1,8	17,8
14	0	0	1,68	11,4	114,3	1,3	13,3	0,5	5,0
15	0	0	0	2,4	23,6	11,4	113,9	1,3	13,4
16	0	0	0	3,8	38,1	9,1	90,7	1,2	11,5
17	0	0	0	2,6	26,5	10,5	105,3	1,3	12,9

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão = ± 0,30 (g L<sup>-1</sup>).

Na sequência, as matrizes contidas nas Tabelas 12 e 13 foram processadas com auxílio do *software* Statistica 8.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% (p<0,05).

A Tabela 14 mostra as equações que descrevem as concentrações de glicose, xilose e arabinose, para hidrólises com cada ácido, previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. Além de considerar os efeitos de cada variável, os modelos contemplam a interação entre elas. Algumas equações não puderam ser previstas pelos modelos matemáticos, pois não apresentaram variáveis estatisticamente significativas.

Os dados resultantes dos ensaios, avaliados através dos diagramas de Pareto, (para os dois ácidos utilizados; Figuras 19 e 20) demonstram os valores do

teste *t* para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado, segundo matriz pré-concebida para os 17 ensaios experimentais, sendo então as variáveis: a concentração do ácido (% v v<sup>-1</sup>), tempo (min) e temperatura (°C).

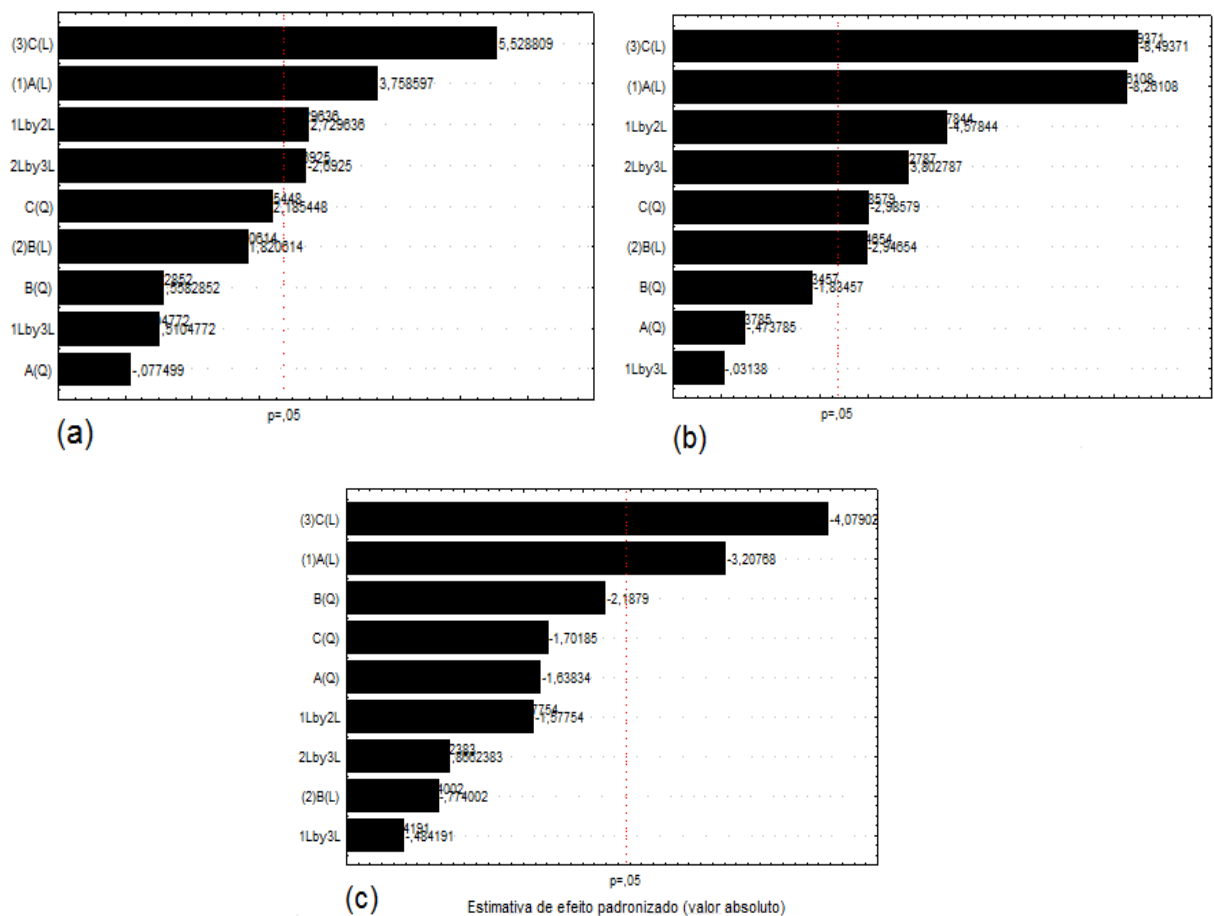
Tabela 14 - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise ácida da CA.

Ácido	Fator resposta	Equação	Ajuste do modelo
HCl	Glicose	$C_G = 4,08 + 4,79 (\text{temperatura}) + 3,25 [\text{HCl}] + 3,08 (\text{HCl} \times \text{tempo}) - 3,04 (\text{tempo} \times \text{temperatura})$	$r^2 : 0,9071$
HCl	Xilose	$C_X = 9,40 - 6,41 (\text{temperatura}) - 6,23 [\text{HCl}] - 4,51 (\text{HCl} \times \text{tempo}) + 3,74 (\text{tempo} \times \text{temperatura}) - 2,48 (\text{temperatura})^2 - 2,22 (\text{tempo})$	$r^2 : 0,9653$
HCl	Arabinose	$C_A = 1,80 - 0,84 (\text{temperatura}) - 0,66 [\text{HCl}]$	$r^2 : 0,8433$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glicose	$C_G = 2,92 + 6,15 (\text{temperatura}) + 2,67 (\text{temperatura})^2 + 2,35 [\text{H}_2\text{SO}_4] + 1,80 (\text{H}_2\text{SO}_4 \times \text{temperatura}) + 1,59 (\text{tempo} \times \text{temperatura}) + 1,19 (\text{tempo})$	$r^2 : 0,9872$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Xilose	$C_X = 10,31 - 7,04 (\text{temperatura}) - 2,86 (\text{temperatura})^2 - 2,36 [\text{H}_2\text{SO}_4] - 2,52 (\text{tempo} \times \text{temperatura})$	$r^2 : 0,9421$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Arabinose	$C_A = 1,26 - 0,76 (\text{temperatura}) - 0,34 (\text{H}_2\text{SO}_4 \times \text{temperatura}) - 0,19 (\text{tempo}) - 0,23 (\text{tempo} \times \text{temperatura})$	$r^2 : 0,9634$

$C_G$  = Concentração glicose g L<sup>-1</sup>;  $C_X$  = Concentração xilose g L<sup>-1</sup>;  $C_A$  = Concentração arabinose g L<sup>-1</sup>.

Para as hidrólise com HCl, a produtividade de glicose se mostrou influenciada de forma linearmente positiva pela concentração ácida e pela temperatura (i. é, maior severidade é desejável); e também pelas interações concentração ácida x tempo e tempo x temperatura, negativa e positivamente, respectivamente (Figura 19, a). Quando se analisou a produção de xilose, concentração ácida e tempo foram relevantes negativamente, de forma linear (i. é, de forma oposta à glicose, mostrando que a liberação será maior se houver menos severidade); temperatura foi

relevante negativamente, tanto para o modelo linear para o quadrático; e as interações concentração ácida x tempo e tempo x temperatura foram relevantes negativa e positivamente, respectivamente (Figura 19, b), ou seja, as interações devem ser consideradas a fim de elevar o rendimento, visto o tempo ser afetado pelas demais variáveis. Ademais, concentração ácida e temperatura afetaram de forma linearmente negativa a produção de arabinose (Figura 19, c), comportamento similar ao verificado para a xilose.

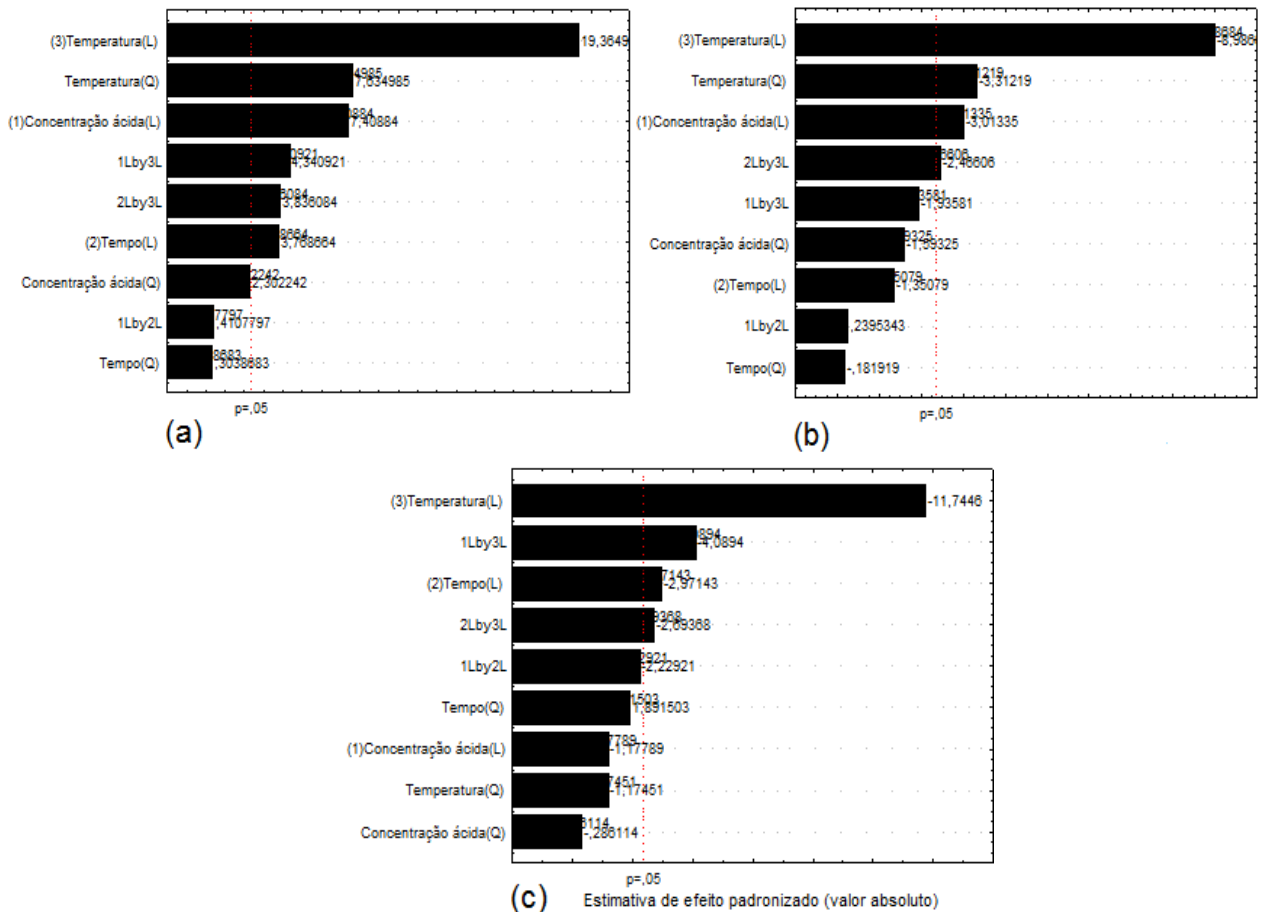


A: Concentração de de ácido (% v v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 19. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c) em hidrólises com a CA.

Nas hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para a produção de glicose, as três variáveis foram significativas (estatisticamente) no modelo linear positivo; temperatura, no modelo quadrático; e ainda as interações concentração de ácido x temperatura e

tempo x temperatura, positivamente (Figura 20, a). Assim, a liberação de glicose é facilitada sob condições experimentais mais severas. Na produtividade de xilose, foram significativas a concentração ácida e temperatura, no modelo linear negativo; temperatura, no modelo quadrático; e a interação tempo x temperatura influenciaram negativamente (Figura 20, b). Perfil oposto ao da glicose, já que a liberação de xilose depende de condições experimentais brandas. Quando se analisou a produção de arabinose, tempo e temperatura, de forma linear negativa foram relevantes; e as interações concentração ácida x temperatura e tempo x temperatura foram relevantes negativamente (Figura 20, c), em perfil similar ao obtido para a xilose.



A: Concentração de ácido (% v<sup>-1</sup>); B: tempo (min); C: temperatura (°C); L: linear; Q: quadrático.

Figura 20. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c), em hidrólises com a CA.

As representações gráficas das respostas, dispostas na Figura 21, relativas às investigações da produção de glicose, xilose e arabinose, auxiliam na visualização dos resultados obtidos nas hidrólises ácidas da CA.

Para hidrólises com HCl, regiões com baixa concentração ácida, baixa temperatura e tempos intermediários de hidrólise indicaram os melhores rendimentos, como no experimento 3 da Tabela 12, em que obteve-se  $17,8 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo, esse experimento privilegia a liberação de xilose, em detrimento da obtenção de glicose. Caso este seja o monossacarídeo de preferência (de acordo com a intenção de aplicação do hidrolisado em etapa posterior), o experimento 14 da Tabela 12, empregando maior temperatura ( $162 \text{ }^\circ\text{C}$ ), tempo (45 min) e concentração ácida ( $2,5\% \text{ v v}^{-1}$ ) intermediários, gerou os melhores resultados. Assim, corroborando com esse raciocínio, na superfície de contorno (Figura 21, a), a condição otimizada se encontra em processos com temperatura a partir ou acima de  $162 \text{ }^\circ\text{C}$  (+1,68), tempos de 35 minutos (-1) e concentrações ácidas maiores que  $4,2\% \text{ v v}^{-1}$  (+1,68). Para comprovar esta região experimental como a melhor condição para este processo, novos experimentos são necessários, e podem resultar em produtividades superiores aquela obtida no experimento 3.

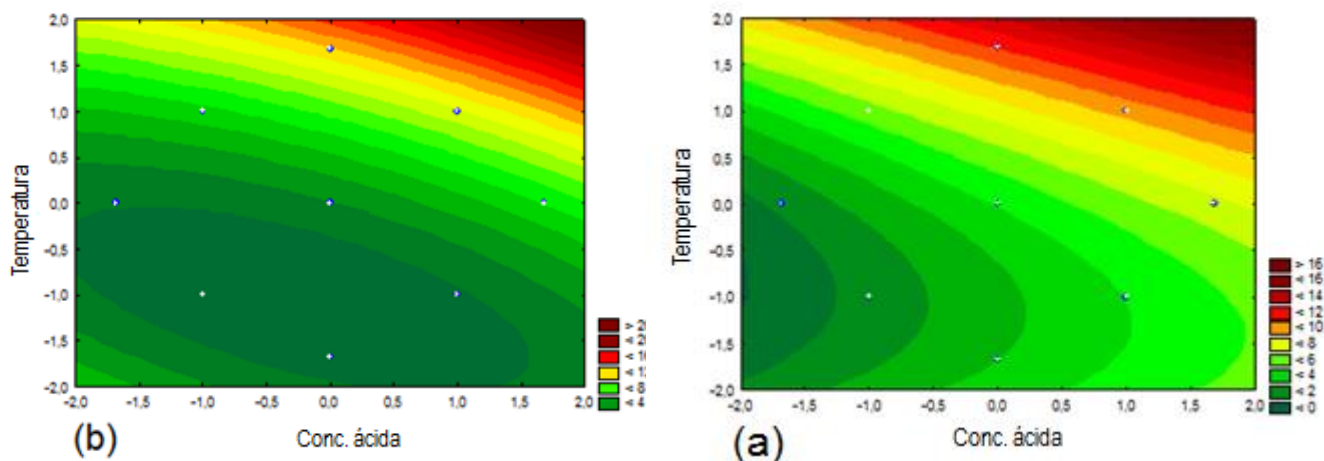


Figura 21. Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da CA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b).

Da mesma forma, para hidrólises com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , experimentos executados em concentração ácida e tempo intermediários e baixa temperatura resultaram nos rendimentos mais elevados, como no experimento 4 da Tabela 13, em que obteve-



se  $17,0 \text{ g L}^{-1}$ . Mas, pode-se ver que esse experimento favorece a liberação de xilose, em detrimento da obtenção de glicose. Assim, caso este seja o monossacarídeo de preferência (de acordo com a intenção de aplicação do hidrolisado em etapa posterior), o experimento 8 da Tabela 13, empregando temperatura ( $155 \text{ }^\circ\text{C}$ ), tempo (55 min) e concentração ácida (que  $3,5\% \text{ v v}^{-1}$ ) intermediários, gerou os rendimentos mais elevados. Então, a superfície de contorno ilustrada na Figura 21, b indica que a condição otimizada é composta por temperaturas a partir ou acima de  $162 \text{ }^\circ\text{C}$  (+1,68), tempos de 55 minutos (+1) e concentrações ácidas maiores que  $4,2\% \text{ v v}^{-1}$  (+1,68). Desse modo, para comprovar a região experimental e possivelmente obter produtividades superiores aquela obtida no experimento 4, novos experimentos são necessários.

Em posse dos dados e da avaliação estatística, é possível comparar-se os rendimentos obtidos para cada ácido. O processo que utilizou HCl obteve maior rendimento em  $12,8 \text{ g L}^{-1}$  e, o processo que utilizou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  obteve maior rendimento em  $13,5 \text{ g L}^{-1}$ , atingindo produtividades consideráveis, se considerarmos a ausência de pré-tratamento alcalino. Estes resultados podem, ainda, ser comparados com aqueles obtidos por Montipó *et al.* (2015), que trabalhando com temperaturas de  $174 \text{ }^\circ\text{C}$ , em hidrólises com concentrações ácidas inferiores a  $0,84\% \text{ v v}^{-1}$ , chegou a rendimentos de  $17,7 \text{ g L}^{-1}$  (para HCl) e  $14,1$  (para  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Esses valores, mais elevados se comparados aos apresentados neste trabalho, no entanto, consideram apenas a condições ótima de liberação de glicose em detrimento dos demais açúcares, o que pode ser uma clara desvantagem em se tratando de geração máxima de fonte de carbono para processos fermentativos.

Condições experimentais ótimas para a produção de glicose se mostraram opostas àquelas que garantem a maior produção de xilose. Enquanto condições mais severas de hidrólise privilegiam a maior produtividade de glicose, condições brandas de hidrólise favorecem claramente a produção de xilose. As melhores condições experimentais, tendo-se em foco a produtividade de arabinose, são similares àquelas para a xilose.

Para comprovação das regiões experimentais de hidrólise à pressão para ambos os ácidos, experimentos confirmatórios são necessários. Em virtude da avaliação do modelo teórico de produção de açúcares da CA é possível almejar o aumento de produtividade e, assim, com concentrações maiores no meio

hidrolisado, ampliar a viabilidade do emprego desse hidrolisado no processo de aproveitamento da CA aqui proposto.

### 5.3.1.2 Hidrólises da microalga *Chlorella* sp.

Nas Tabelas 15 e 16 encontram-se os valores codificados dos ensaios de cada ácido e os respectivos resultados, sendo que os valores foram determinados por HPLC-RID.

Tabela 15 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MA.

Ensaio	HCl (v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	HCl			
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>
1	-1	-1	-1	5,73	57,3	3,73	37,3
2	-1	-1	1	2,85	28,5	1,95	19,5
3	-1	1	-1	4,64	46,4	3,31	33,1
4	-1	1	1	2,34	23,4	1,71	17,1
5	1	-1	-1	3,99	39,9	2,91	29,1
6	1	-1	1	0,42	4,2	0,77	7,7
7	1	1	-1	2,01	20,1	1,42	14,2
8	1	1	1	0,64	6,4	0,32	3,2
9	0	0	-1,68	4,14	41,4	3,08	30,8
10	0	0	1,68	0,67	6,7	0,62	6,2
11	0	-1,68	0	1,82	18,2	1,22	12,2
12	0	1,68	0	1,17	11,7	0,93	9,3
13	-1,68	0	0	5,13	51,3	2,60	26,0
14	1,68	0	0	0,28	2,8	0,97	9,7
15	0	0	0	1,61	16,1	1,17	11,7
16	0	0	0	1,29	12,9	0,88	8,8
17	0	0	0	1,91	19,1	1,29	12,9
18	0	0	0	2,11	21,1	1,43	14,3

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> MA). Desvio padrão (glicose) = ± 0,36 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,23 (g L<sup>-1</sup>).

De acordo com a Tabela 15, as concentrações de glicose variaram de 0,28 a 5,73 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 2,8 a 57,3 mg glicose g<sup>-1</sup> MA ; e, as concentrações de xilose variaram de 0,32 a 3,73 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um

rendimento de 3,2 a 37,3 mg xilose g<sup>-1</sup> MA - para HCl. A arabinose não foi quantificada para essa biomassa, pois as MAs não apresentam hemicelulose na sua camada celular, não gerando assim quantidades significativas (passíveis de identificação e quantificação) deste açúcar.

O experimento 8 da Tabela 15, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 169 °C e 50 min, demonstrou que concentrações elevadas do referido ácido são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis e, por isso gerou apenas 0,96 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 9,6 mg açúcares g<sup>-1</sup> MA. Da mesma forma, com uma liberação de açúcares de 1,19 g L<sup>-1</sup>, indicando um rendimento de 11,9 mg açúcares g<sup>-1</sup> MA, o experimento 6 da Tabela 15, usando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 169 °C e 40 min, mostrou que concentrações ácidas e temperaturas elevadas não são adequados para a obtenção dos maiores rendimentos de açúcares.

Tabela 16 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MA.

Ensaio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>
1	-1	-1	-1	7,31	73,1	2,61	26,1
2	-1	-1	1	4,53	45,3	3,21	32,1
3	-1	1	-1	6,09	60,9	4,56	45,6
4	-1	1	1	3,64	36,4	2,43	24,3
5	1	-1	-1	5,28	52,8	3,25	32,5
6	1	-1	1	0,99	9,9	1,38	13,8
7	1	1	-1	5,05	50,5	2,60	26,0
8	1	1	1	1,59	15,9	1,52	15,2
9	0	0	-1,68	6,11	61,1	3,45	34,5
10	0	0	1,68	1,95	19,5	1,34	13,4
11	0	-1,68	0	5,09	50,9	3,38	33,8
12	0	1,68	0	4,25	42,5	2,14	21,4
13	-1,68	0	0	3,60	36,0	2,59	25,9
14	1,68	0	0	4,09	40,9	2,44	24,4
15	0	0	0	4,90	49,0	2,99	29,9
16	0	0	0	3,83	38,3	3,43	34,3
17	0	0	0	3,50	35,0	2,66	26,6
18	0	0	0	5,40	54,0	2,99	29,9

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> CA). Desvio padrão (glicose) = ± 0,89 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,32 (g L<sup>-1</sup>).

A Tabela 16 mostra, para o planejamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que as concentrações de glicose variaram de 0,99 a 7,31 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 9,9 a 73,1 mg glicose g<sup>-1</sup> MA; e, que as concentrações de xilose variaram de 1,34 a 4,56 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 13,4 a 45,6 mg xilose g<sup>-1</sup> MA.

O experimento 6 da Tabela 16, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 169°C e 40 min, obteve os piores resultados (2,37 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 23,7 mg açúcares g<sup>-1</sup> MA) dentro do planejamento executado, o que indica que concentrações elevadas do referido ácido são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis. Ademais, o experimento 8 da Tabela 16, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 169 °C e 50 min, demonstrou que concentrações elevadas deste ácido também são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis e, por isso gerou 3,11 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 31,1 mg açúcares g<sup>-1</sup> MA.

Os piores rendimentos foram obtidos com o experimentos 6 (empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 169°C e 40 min) e 8 (empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 169 °C e 50 min), para ambos os ácidos, deixando claro que concentrações ácidas e temperaturas elevadas são indesejáveis na obtenção dos açúcares em estudo, quando a biomassa MA é utilizada.

Na sequência, as matrizes contidas nas Tabelas 15 e 16 foram processadas com auxílio do *software* Statistica 8.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% (p<0,05).

A Tabela 17 mostra as equações que descrevem as concentrações de glicose, xilose e arabinose, para hidrólises com cada ácido, previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. Além de considerar os efeitos de cada variável, os modelos contemplam a interação entre elas.

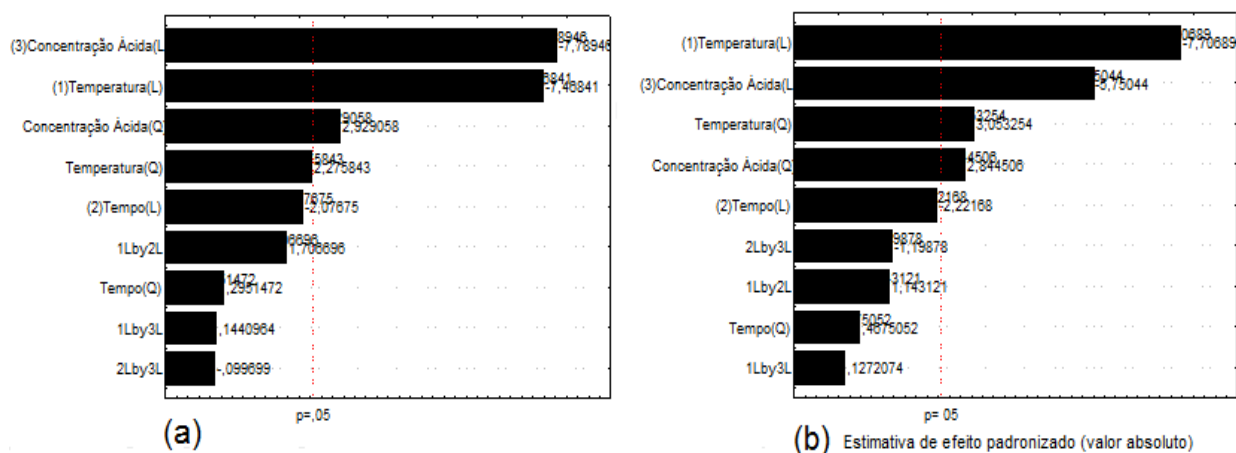
Os dados resultantes dos ensaios, avaliados através dos diagramas de Pareto, (para os dois ácidos utilizados; Figuras 22 e 23) demonstram os valores do teste *t* para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado, segundo matriz pré-concebida para os 18 ensaios experimentais, sendo então as variáveis: a concentração do ácido (% v v<sup>-1</sup>), tempo (min) e temperatura (°C).

Tabela 17 - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos dos planejamentos da hidrólise ácida da MA.

Ácido	Fator resposta	Equação	Ajuste do modelo
HCl	Glicose	$C_G = 1,69 - 2,43 [\text{HCl}] - 2,33 (\text{temperatura}) + 0,95 [\text{HCl}]^2$	$r^2 : 0,9443$
HCl	Xilose	$C_X = 1,17 - 1,58 (\text{temperatura}) - 1,18 [\text{HCl}] + 0,65 (\text{temperatura})^2 + 0,60 [\text{HCl}]^2$	$r^2 : 0,9350$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glicose	$C_G = 4,40 - 2,92 (\text{temperatura})$	$r^2 : 0,8230$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Xilose	$C_X = 3,00 - 1,17 (\text{temperatura})$	$r^2 : 0,7037$

$C_G$  = Concentração glicose g L<sup>-1</sup>;  $C_X$  = Concentração xilose g L<sup>-1</sup>.

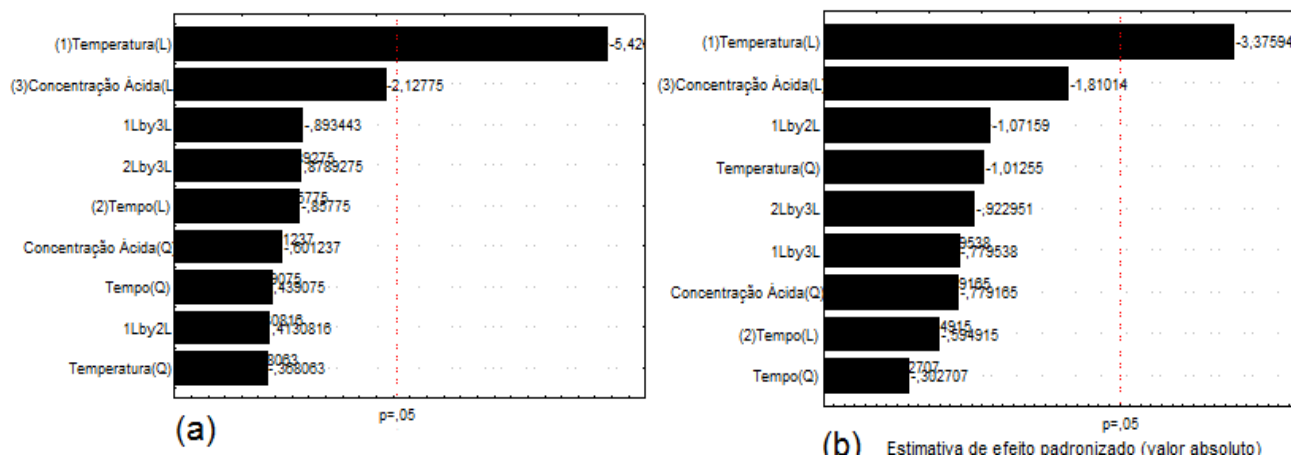
Para as hidrólises com HCl, a produtividade de glicose se mostrou influenciada de forma linearmente negativa pela concentração ácida e temperatura; e positivamente pela concentração ácida, no modelo quadrático (Figura 22, a). Quando se analisou a produção de xilose, tanto concentração ácida quanto temperatura afetaram de forma negativa e positiva, nos modelos linear e quadrático, respectivamente (Figura 22, b). Os diagramas de Pareto apresentaram perfil similar para glicose e xilose, o contrário do observado nos diagramas para as hidrólises com a CA.



L: linear; Q: quadrático.

Figura 22. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MA.

Da mesma forma, para as hidrólises com  $H_2SO_4$ , tanto na produção de glicose (Figura 23, a) quanto na produção de xilose (Figura 23, b), apenas a temperatura foi relevante negativamente, de forma linear. Bem como para as hidrólises clorídricas com a MA, os diagramas de Pareto para as hidrólises sulfúricas apresentaram perfil similar para glicose e xilose, o contrário do observado nos diagramas para as hidrólises com a CA.



L: linear; Q: quadrático.

Figura 23. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando  $H_2SO_4$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MA.

As representações gráficas das respostas, dispostas na Figura 24, relativas às investigações da produção de glicose, xilose e arabinose, auxiliam na visualização dos resultados obtidos nas hidrólises ácidas da MA.

Para as hidrólises com HCl, os rendimentos mais altos foram obtidos com uso de condições brandas de concentração ácida, tempo e temperatura, como no experimento 1 da Tabela 15, em que obteve-se  $9,46 \text{ g L}^{-1}$ . Todavia, tomando como base a superfície de contorno (Figura 24, a), experimentos confirmatórios na condição otimizada liberaram  $10,01 \text{ g L}^{-1}$ , indicando que a região ótima se encontra em processos com temperaturas ainda menores ( $150^\circ\text{C}$ ) (-1,68) e concentrações ácidas de  $0,5\% \text{ v v}^{-1}$  de ácido (-1,68). Apesar de o tempo não se mostrar uma variável relevante no diagrama de Pareto, esse foi otimizado em 45 min (0).

Da mesma forma, para hidrólises com  $H_2SO_4$ , baixas concentrações ácidas, tempos intermediários e baixas temperaturas apresentaram os melhores resultados, como no experimento 3 da Tabela 16, que gerou  $10,65 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo,

experimentos confirmatórios tomando por base a superfície de contorno ilustrada na Figura 24, b indicaram que a condição otimizada (com liberação de  $13,56 \text{ g L}^{-1}$ ) é caracterizada por temperaturas mais baixas ( $152 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e concentrações ácidas centrais ou mais elevadas ( $2,0\% \text{ v v}^{-1}$ ). O tempo foi otimizado em  $55 \text{ min}$  ( $+1,68$ ), mesmo não tendo sido indicado como uma variável significativa no diagrama de Pareto

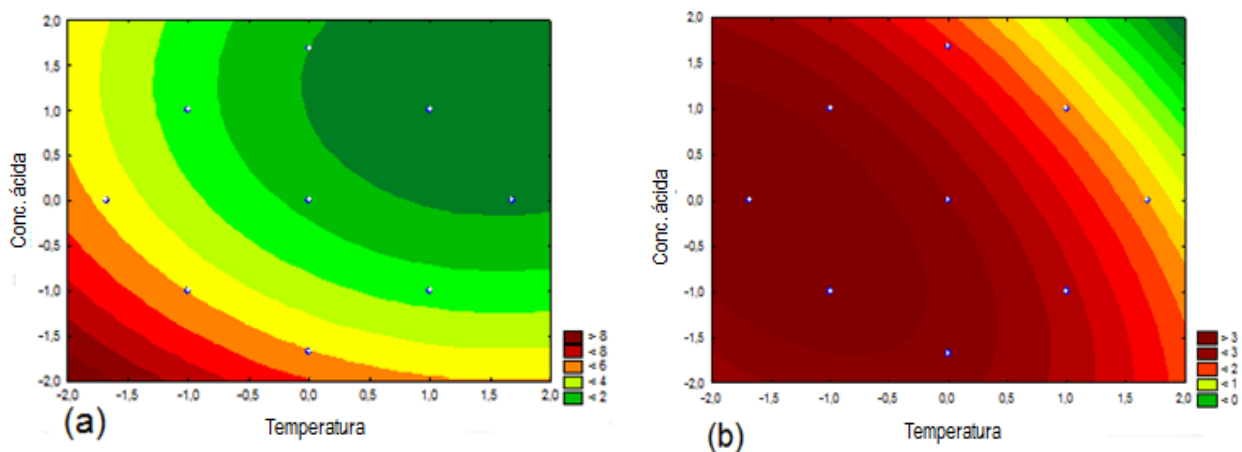


Figura 24. Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos da MA, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b).

Em posse dos dados e da avaliação estatística, é possível comparar-se os rendimentos obtidos para cada ácido. O processo que utilizou ácido clorídrico obteve maior rendimento em  $9,46 \text{ g L}^{-1}$  e, o processo que utilizou ácido sulfúrico obteve maior rendimento em  $10,65 \text{ g L}^{-1}$ , atingindo produtividades consideráveis.

Para as hidrólises ácidas à pressão da MA, condições experimentais ótimas - mais brandas - de produção de glicose e xilose foram similares, ao contrário do observado para hidrólises ácidas da CA, em que condições de maior severidade geram maior liberação de glicose, em detrimento da liberação de xilose.

A comprovação das regiões experimentais ideais - obtidas das superfícies de contorno -, foi feita através de experimentos confirmatórios (bem sucedidos), já citados nessa seção, que resultaram em  $10,1 \text{ g L}^{-1}$  para processos com o ácido clorídrico, e  $13,56 \text{ g L}^{-1}$  para processos com ácido sulfúrico.

A obtenção de rendimentos inferiores para as hidrólises ácidas de MA em relação aos obtidos com a CA se deve, provavelmente, à concentração de celulose e hemicelulose (inexistente) na matriz de cada uma dessas biomassas. Como a

fração de celulose na MA é menor e a hemicelulose não está presente, é razoável esperar que os rendimentos desta etapa para MA sejam menores.

#### 5.3.1.3 Hidrólises ácidas da Microalga *Chlorella* sp. residual

Nas Tabelas 18 e 19 encontram-se os valores codificados dos ensaios de cada ácido e os respectivos resultados, sendo que os valores foram determinados por HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 18, as concentrações de glicose variaram de 0,0 a 3,82 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0,0 a 38,2 mg glicose g<sup>-1</sup> MAR; e, as concentrações de xilose variaram de 0,29 a 2,08 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 2,9 a 20,8 mg xilose g<sup>-1</sup> MAR - para HCl. A arabinose não foi quantificada para essa biomassa, pois as MAs não apresentam hemicelulose na sua camada celular, não gerando assim quantidades significativas (passíveis de identificação e quantificação) deste açúcar.

O experimento 8 da Tabela 18, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 169 °C e 50 min, demonstrou que concentrações elevadas deste ácido são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis e, por isso gerou apenas 0,29 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 2,9 mg açúcares g<sup>-1</sup> MAR. Com uma liberação de açúcares de 0,46 g L<sup>-1</sup>, indicando um rendimento de 4,6 mg açúcares g<sup>-1</sup> MA, o experimento 6 da Tabela 18, usando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de HCl, 169 °C e 40 min, mostrou que concentrações ácidas e temperaturas elevadas agem em detrimento da obtenção de glicose .

Da mesma forma, de acordo com a Tabela 19, para o planejamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as concentrações de glicose variaram de 0,81 a 4,02 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 8,1 a 40,2 mg glicose g<sup>-1</sup> MAR; e, as concentrações de xilose variaram de 0,50 a 2,59 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 5,0 - 25,9 mg xilose g<sup>-1</sup> MAR.



Tabela 18 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com HCl, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MAR.

Ensaio	HCl (v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	HCl			
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>
1	-1	-1	-1	3,57	35,7	2,08	20,8
2	-1	-1	1	1,88	18,8	1,12	11,2
3	-1	1	-1	3,08	30,8	1,45	14,5
4	-1	1	1	1,29	12,9	0,72	7,2
5	1	-1	-1	1,15	11,5	0,69	6,9
6	1	-1	1	0,00	0,00	0,46	4,6
7	1	1	-1	1,61	16,1	1,04	10,4
8	1	1	1	0,00	0,00	0,29	2,9
9	0	0	-1,68	1,92	19,2	1,25	12,5
10	0	0	1,68	0,00	0,00	0,32	3,2
11	0	-1,68	0	1,48	14,8	0,60	6,0
12	0	1,68	0	1,35	13,5	1,12	11,2
13	-1,68	0	0	3,82	38,2	1,92	19,2
14	1,68	0	0	0,00	0,00	0,51	5,1
15	0	0	0	1,89	18,9	1,11	11,1
16	0	0	0	1,87	18,7	1,00	10,0
17	0	0	0	1,62	16,2	0,88	8,8
18	0	0	0	1,98	19,8	1,27	12,7

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> MA). Desvio padrão (glicose) = ± 0,15 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,17(g L<sup>-1</sup>).

De acordo com a Tabela 19, o experimento 6, empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 169°C e 40 min, obteve os piores resultados (1,41 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 14,1 mg açúcares g<sup>-1</sup> MAR dentro do planejamento executado), o que indica que concentrações elevadas do referido ácido também são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis. Ademais, O experimento 8 da Tabela 19, usando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 169 °C e 50 min, demonstrou que concentrações elevadas do ácido são desfavoráveis à liberação de açúcares fermentescíveis, gerando apenas 1,53 g L<sup>-1</sup> de açúcares liberados, indicando um rendimento de 15,3 mg açúcares g<sup>-1</sup> MAR.

Tabela 19 - Resultados do delineamento composto central rotacional, para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e seus fatores-resposta, referentes ao processo com MAR.

Ensaio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
				C <sub>Glicose</sub>	R <sub>Glicose</sub>	C <sub>Xilose</sub>	R <sub>Xilose</sub>
1	-1	-1	-1	3,95	39,5	2,59	25,9
2	-1	-1	1	2,26	22,6	1,37	13,7
3	-1	1	-1	3,79	37,9	2,50	25,0
4	-1	1	1	1,72	17,2	1,24	12,4
5	1	-1	-1	2,51	25,1	1,22	12,2
6	1	-1	1	0,91	9,1	0,50	5,0
7	1	1	-1	2,25	22,5	1,44	14,4
8	1	1	1	0,81	8,1	0,72	7,2
9	0	0	-1,68	4,02	40,2	2,16	21,6
10	0	0	1,68	1,27	12,7	0,77	7,7
11	0	-1,68	0	2,98	29,8	1,69	16,9
12	0	1,68	0	2,06	20,6	1,58	15,8
13	-1,68	0	0	3,20	32,0	1,74	17,4
14	1,68	0	0	0,82	8,2	0,73	7,3
15	0	0	0	2,40	24,0	1,59	15,9
16	0	0	0	1,62	16,2	1,15	11,5
17	0	0	0	2,12	21,2	1,44	14,4
18	0	0	0	1,64	1,64	1,30	13,0

C = Concentração (g L<sup>-1</sup>); R = rendimento (mg g<sup>-1</sup> MA). Desvio padrão (glicose) = ±0,38 (g L<sup>-1</sup>); desvio padrão (xilose) = ± 0,19 (g L<sup>-1</sup>).

Assim como para a hidrólise ácida da MA, os piores rendimentos para a hidrólise ácida da MAR, foram obtidos com os experimentos 6 (empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 169°C e 40 min) e 8 (empregando 3,5% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 169 °C e 50 min), para ambos os ácidos, mostrando que elevadas concentrações ácidas e temperaturas são indesejáveis na obtenção dos açúcares em estudo.

Na sequência, as matrizes contidas nas Tabelas 18 e 19 foram processadas com auxílio do *software* Statistica 8.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% (p<0,05).

A Tabela 20 mostra as equações que descrevem as concentrações de glicose, xilose e arabinose, para hidrólises com cada ácido, previstas pelos modelos

matemáticos em função das variáveis independentes. Além de considerar os efeitos de cada variável, os modelos contemplam a interação entre elas.

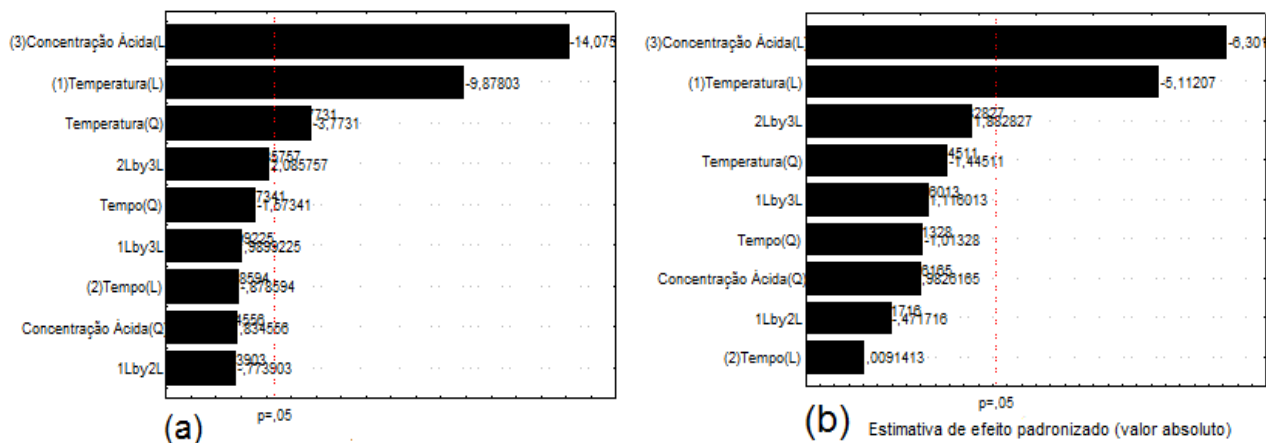
Tabela 20 - Apresentação das equações que descrevem as produções (em termos de concentrações) para glicose, xilose e arabinose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes dos planejamentos da hidrólise ácida da MAR.

Ácido	Fator resposta	Equação	Ajuste do modelo
HCl	Glicose	$C_G = 1,83 - 1,97 [\text{HCl}] - 1,38 (\text{temperatura}) - 0,55 (\text{temperatura})^2$	$r^2 : 0,9756$
HCl	Xilose	$C_X = 1,06 - 0,76 [\text{HCl}] - 0,62 (\text{temperatura})$	$r^2 : 0,9043$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glicose	$C_G = 1,95 - 1,67 (\text{temperatura}) - 1,35 [\text{H}_2\text{SO}_4] + 0,43 (\text{temperatura})^2 - 0,38 (\text{tempo})$	$r^2 : 0,9657$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Xilose	$C_X = 1,37 - 0,91 (\text{temperatura}) - 0,80 [\text{H}_2\text{SO}_4]$	$r^2 : 0,9581$

$C_G$  = Concentração glicose g L<sup>-1</sup>;  $C_X$  = Concentração xilose g L<sup>-1</sup>.

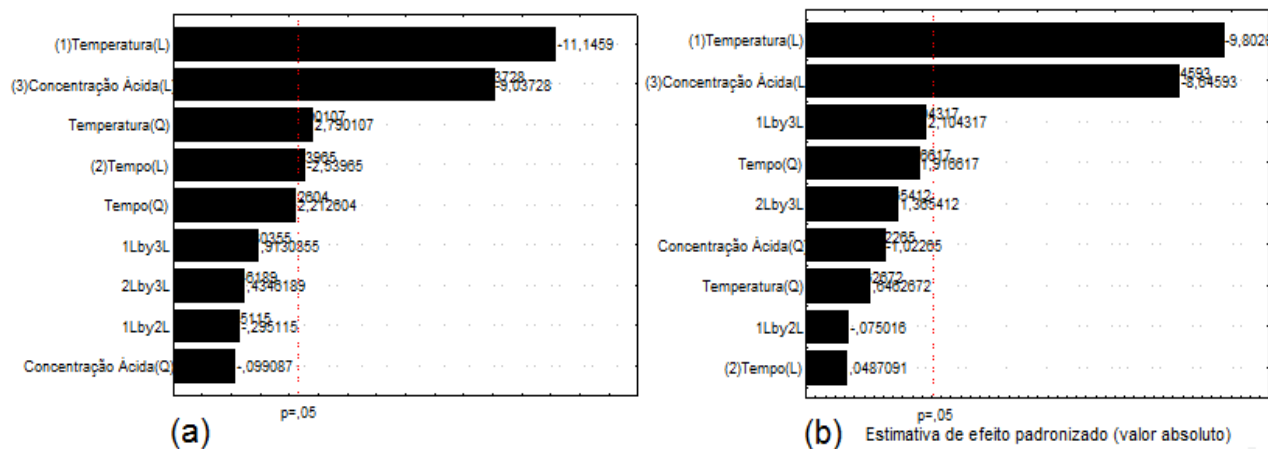
Os dados resultantes dos ensaios, avaliados através dos diagramas de Pareto, (para os dois ácidos utilizados; Figuras 25 e 26) demonstram os valores do teste *t* para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado, segundo matriz pré-concebida para os 18 ensaios experimentais, sendo então as variáveis: a concentração do ácido (% v v<sup>-1</sup>), tempo (min) e temperatura (°C).

Para as hidrólises com HCl, a produtividade de glicose se mostrou influenciada negativamente pela concentração ácida, de forma linear; e também negativamente pela temperatura, sendo tanto para o modelo linear quanto para o modelo quadrático (Figura 25, a). A produção de xilose também foi afetada negativamente pela concentração ácida e temperatura, ambas de forma linear (Figura 25, b). Assim como foi observado para MA, glicose e xilose apresentaram diagramas de Pareto com perfil similar – para MAR.



L: linear; Q: quadrático

Figura 25. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando HCl, com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MAR.



L: linear; Q: quadrático.

Figura 26. Diagramas de Pareto do delineamento composto central rotacional empregando  $H_2SO_4$ , com os fatores-resposta para liberação de glicose (a) e xilose (b) em hidrólises com a MAR.

Para as hidrólises com  $H_2SO_4$ , a produção de glicose teve como variáveis relevantes negativamente concentração ácida, tempo e temperatura, de forma linear; e positivamente temperatura, no modelo quadrático (Figura 26, a). De forma linearmente negativa, concentração ácida e temperatura afetaram a produção de xilose (Figura 26, b).

As representações gráficas das respostas, dispostas na Figura 27, relativas às investigações da produção de glicose, xilose e arabinose, auxiliam na visualização dos resultados obtidos nas hidrólises ácidas da MAR.

Para hidrólises com HCl, os rendimentos mais altos foram obtidos com uso de condições brandas de concentração ácida e intermediárias de tempo e temperatura, como no experimento 13 da Tabela 18, em que obteve-se 5,74 g açúcares L<sup>-1</sup>. Tomando como base a superfície de contorno (Figura 27, a), a condição otimizada (que liberou 8,45 g L<sup>-1</sup>) nos experimentos confirmatórios se encontra em regiões de processo mais brandas com temperaturas de 150 °C (-1,68), concentrações ácidas de 0,5% v v<sup>-1</sup> (-1,68) e tempos de 40 min (-1).

Para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, baixas concentrações ácidas, tempo e temperaturas apresentaram os melhores resultados, como no experimento 1 da Tabela 19, que gerou 6,54 g açúcares L<sup>-1</sup>. A superfície de contorno ilustrada na Figura 27, b indica que a condição otimizada (que liberou 8,42 g açúcares L<sup>-1</sup>) nos experimentos confirmatórios é composta pelas regiões mais brandas com baixas temperaturas (140°C), concentrações ácidas de 0,5% v v<sup>-1</sup> e tempos de 37 min.

Em posse dos dados e da avaliação estatística, é possível comparar-se os rendimentos obtidos para cada ácido. O processo que utilizou ácido clorídrico obteve maior rendimento em 5,74 g L<sup>-1</sup> e, o processo que utilizou ácido sulfúrico obteve maior rendimento em 6,54 g L<sup>-1</sup>, atingindo produtividades consideráveis, se tratando de uma biomassa residual.

Para os processos de hidrólise ácida à pressão da MAR as condições experimentais ótimas - mais brandas - observadas foram similares para a produção de glicose e xilose, assim como para a MA. Essa avaliação deve ser feita tendo-se em vista o processo de extração lipídica à qual a MA é submetida, a partir da qual resulta a MAR, conforme descrito na seção 4.2. Ou seja, ao comparar-se ambas regiões ótimas de liberação de açúcares, atestando que os experimentos de maior rendimento se situam na mesma faixa experimental, é possível concluir que a MAR, subproduto de processo de extração, é adequada ao aproveitamento segundo a rota produtiva descrita neste trabalho.

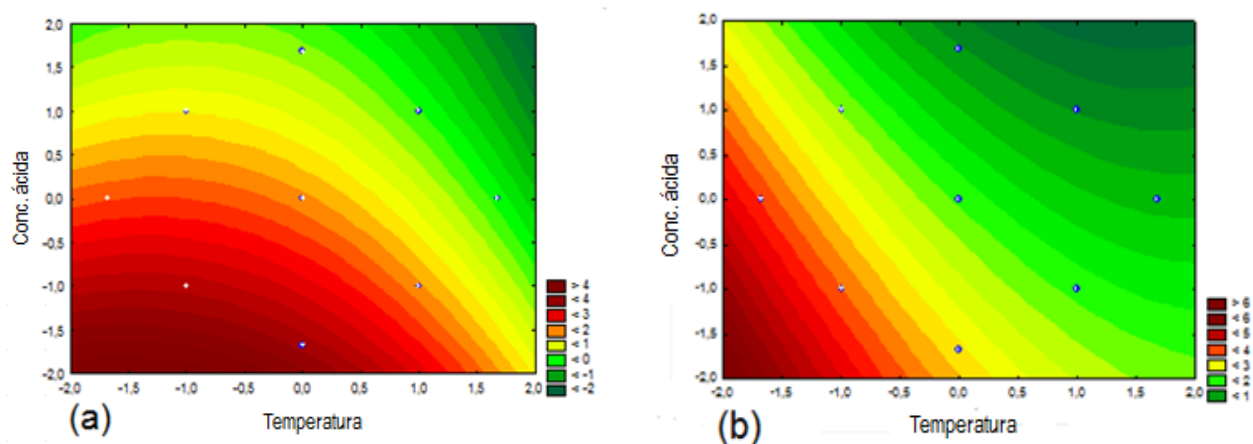


Figura 27. Superfícies de contorno dos processos hidrolíticos, com MAR, visando rendimento de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) HCl (a) e com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b).

A comprovação das regiões experimentais ótimas - obtidas das superfícies de contorno - foi feita através de experimentos confirmatórios (bem sucedidos), já citados nessa seção, que resultaram em  $8,45 \text{ g L}^{-1}$  para processos com o ácido clorídrico, e  $8,42 \text{ g L}^{-1}$  para processos com ácido sulfúrico.

#### 5.4 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado

Visando comprovar a viabilidade do emprego dos hidrolisados enquanto substratos fermentativos, foi executada uma avaliação a cerca da fermentabilidade dos hidrolisados em cultivo com a cepa *R. radiobacter*.

Para geração do volume de hidrolisado necessário para a fermentação, fez-se uso das condições otimizadas para ambos os ácidos, tanto para os hidrolisados de CA quanto para os hidrolisados de MA e MAR.

O processo de destoxificação do hidrolisado foi executado com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos, provenientes da etapa hidrolítica, e que atuam por natureza como inibidores na fermentação (ácidos acético e fórmico). Caso contrário, o meio não poderia ser usado como substrato fermentativo, devido a presença elevada de inibidores (PEDROSO *et al.*, 2017).

O cultivo foi feito em escala de bancada, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e em pH inicial 7,0, segundo metodologia já conhecida no LATER (MONTIPÓ *et al.*, 2016; PEDROSO *et al.*, 2017). Conforme a Tabela 21, os meios foram suplementados com fontes de

carbono e nitrogênio. O experimento 9, utilizando hidrolisado clorídrico, foi o único frasco que não fermentou (Figura 28), mesmo após 60 h de processo, provavelmente devido às condições de destoxificação aplicadas (não ideais para o hidrolisado clorídrico) e à fonte de nitrogênio adicionada (demanda esforço de otimização). Novos experimentos para reavaliação do tratamento de destoxificação e fonte de nitrogênio devem ser feitos.

Tabela 21 – Fermentação com *R. radiobacter*, substratos fermentativos, fontes de Nitrogênio e Carbono, com o consumo de açúcares para cada experimento.

Experimento	Hidrolisado	Biomassa	Fonte de Nitrogênio	Fonte N (g L <sup>-1</sup> )	Fonte C (g L <sup>-1</sup> )	Consumo 60h (%)	Consumo (g L <sup>-1</sup> )
1	Sulfúrico	MA	Extrato de levedura	2,0	10,0	99,5	16,8
2	Sulfúrico	MA	Extrato de levedura	6,0	10,0	99,5	16,8
3	Sulfúrico	MA	Ureia	6,0	10,0	99,5	15,7
4	Sulfúrico	MA	Ureia	10,0	10,0	99,5	17,3
5	Sulfúrico	MAR	Extrato de levedura	6,0	10,0	99,4	13,2
6	Sulfúrico	MAR	Extrato de levedura	6,0	10,0	99,5	14
7	Sulfúrico	MAR	Ureia	6,0	10,0	99,5	16,2
8	Sulfúrico	MAR	Ureia	10,0	10,0	99,2	14,6
9	Clorídrico	CA	Extrato de levedura	6,0	10,0	0	0
10	Sulfúrico	CA	Extrato de levedura	6,0	0,0	95,2	6,6

Em 12 horas de fermentação é possível perceber que o metabolismo bacteriano estava funcionando em plena atividade em virtude do elevado consumo de açúcares do meio. O mesmo pode ser dito se forem avaliadas as concentrações de açúcares presentes em 24 horas de fermentação, pois neste momento havia no meio já menos de 4 g L<sup>-1</sup> (Figura 28). O tempo de 60 horas, usado para a avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados, é adotado com base em publicações da área,

bem como pela experiência prévia do LATER acerca do processo de fermentação dos hidrolisados de biomassa (MONTIPÓ *et al.*, 2016; PEDROSO *et al.*, 2017).

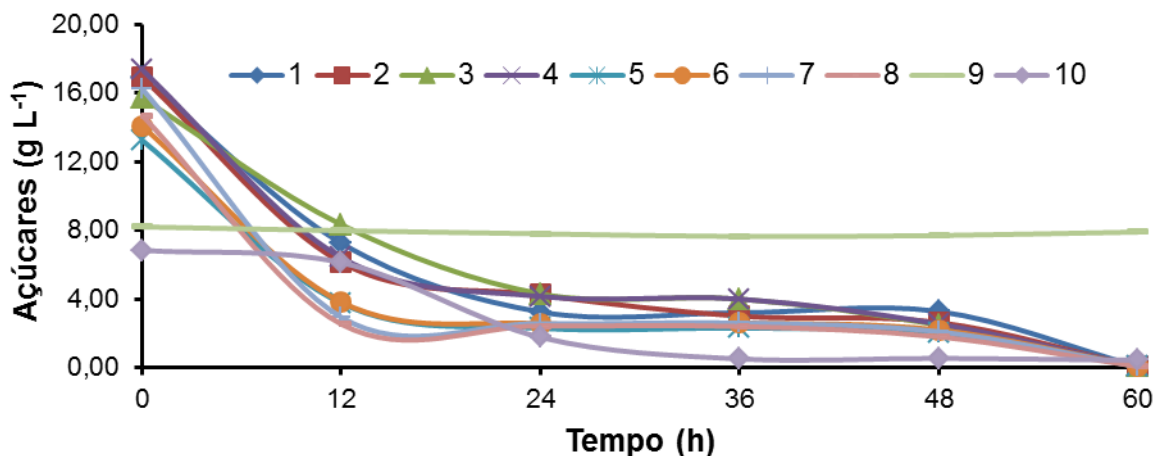


Figura 28. Cinética do processo fermentativo (*R. radiobacter*) em hidrolisado destoxificado, a 30 °C em shaker, evidenciando o consumo de açúcares x tempo de fermentação.

O consumo total de açúcares, >95%, evidencia que os hidrolisados das biomassas se mostram adequados ao cultivo bacteriano, possibilitando concluir que é possível obter produtos biotecnológicos de elevado valor agregado a partir do processo de tratamento das biomassas, conforme é proposto no presente trabalho.

Novos experimentos acerca da fermentabilidade dos hidrolisados serão feitos, visando atestar a viabilidade do processo em estudo e, também, obter novos produtos biotecnológicos, com elevado interesse industrial, que elevem ainda mais a importância da presente proposta de aproveitamento de biomassas residuais.

## 5.5 Avaliação econômica do processo

Visando assegurar a viabilidade econômica do processo de obtenção de monossacarídeos fermentescíveis a partir das biomassas CA, MA e MAR, fez-se uma análise econômica aproximada do processo, levando-se em consideração apenas os preços comerciais dos reagentes utilizados e o valor agregado dos monossacarídeos obtidos.



Assim, tomando-se como base um montante de 1000 kg de biomassa (sem valor comercial) e os custos dos reagentes utilizados nas etapas de hidrólise alcalina e ácida, o custo total do processo de produção pode ser observado na Tabela 22.

Tabela 22 – Custo total do processo de produção de monossacarídeos baseado no valor dos reagentes utilizados nas etapas alcalina e ácida.

Reagente	Preço por kg	Quantidade em kg*	Total (R\$)**
NaOH	19,5	85	1657,50
Ca(OH) <sub>2</sub>	22,5	85	1912,50
KOH	55,0	85	4675,00
CaCO <sub>3</sub>	15,0	85	1275,00
NH <sub>4</sub> OH	25,0	85	2125,00
HCl	31,5	100	3150,00
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	76,5	100	7650,00
			22445,00

\*Quantidade necessária média para tratar 1000 kg de biomassa; \*\* Os valores utilizados referem-se a produtos grau P.A do catálogo Sigma-Aldrich.

Na Tabela 23, está representado o valor agregado dos monossacarídeos fermentescíveis gerados no processo hidrolítico, de alguns produtos que podem ser obtidos através dos açúcares (por experiência do LATER), bem como as matérias-primas utilizadas em cada processo.

Fica clara a viabilidade econômica do bioprocessamento (partindo-se de biomassas com pouco ou nenhum valor agregado), visto que o valor agregado dos açúcares gerados é amplamente positivo, em vários casos, superando o custo de produção total. Ademais, conforme a Tabela 24, vários produtos podem ser obtidos a partir dos monossacarídeos gerados, como xilitol (RAMBO *et al.*, 2013), ácido succínico (BEVILAQUA *et al.*, 2015), ácido levulínico (BEVILAQUA *et al.*, 2013), ácido láctico (MONTIPÓ *et al.*, 2016) e ácido itacônico (PEDROSO *et al.*, 2017).

Tabela 23 – Valor agregado dos monossacarídeos gerados no processo hidrolítico e de produtos passíveis de serem obtidos através destes açúcares.

<b>Produto</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Valor agregado* (R\$/t biomassa*</b>
Glicose	Casca de arroz, Microalga e Microalga residual	3200,00
Xilose	Casca de arroz, Microalga e Microalga residual	252000,00
Arabnose	Casca de arroz, Microalga e Microalga residual	78000,00
Xilitol	Casca de arroz	523,00
Hidroximetilfurfural	Casca de arroz	27340,00
Ácido succínico	Casca de arroz	55800,00
Ácido levulínico	Casca de arroz	58900,00
Ácido láctico	Casca de arroz e Bagaço de agave	1136,00
Ácido itacônico	Casca de arroz	19500,00

\* Os valores utilizados referem-se a produtos grau P.A do catálogo Sigma-Aldrich e devem ser considerados apenas como parâmetro grosseiro de avaliação do possível valor agregado máximo dos bioprodutos gerados a partir das biomassas estudadas.

O balanço econômico aqui proposto, ainda que preliminar e simplificado, permite compreender a importância em elevar-se o rendimento de açúcares de cada biomassa através das abordagens aqui propostas. Graças aos resultados, é possível, então, projetar viabilidade econômica da rota proposta, atestando o sucesso na otimização experimental adotada.

## 6. CONCLUSÕES

Ao considerar a série de possibilidades oferecidas pela biotecnologia para a produção de insumos químicos através de processos mais sustentáveis, os resultados obtidos neste trabalho mostram que as biomassas CA, MA e MAR têm potencial enquanto matérias-primas para a produção de monossacarídeos fermentescíveis e bioprodutos derivados destes.

Com auxílio de quimiometria, as hidrólises alcalinas em sistema aberto - compreendendo o uso de NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , KOH,  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$  - revelaram ser possível atacar a fração lignina das biomassas e, dessa forma, contribuir para a elevação do rendimento de açúcares fermentescíveis na etapa ácida subsequente. Tendo como referência ensaios prévios com a CA (com liberação de 14,4 g açúcares  $\text{L}^{-1}$ ), os álcalis utilizados na etapa de pré-tratamento que apresentaram os melhores resultados foram KOH (65 °C, por 60 min, com 4,25%  $\text{m v}^{-1}$  de álcali) e NaOH (65 °C, por 35 min, com 4,25%  $\text{m v}^{-1}$  de álcali), aumentando a produção de açúcares fermentescíveis para 24,0 e 21,7 g açúcares  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. O processo de hidrólise alcalina, em sistema aberto, com as biomassas de MA não foi completado devido à dificuldades enfrentadas no decorrer das operações unitárias, exigindo esforços adicionais de investigação.

Para as hidrólises ácidas à pressão da biomassa CA, com HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , mais experimentos serão necessários para confirmar a região das condições otimizadas; todavia, já foram obtidas concentrações de 12,8 g  $\text{L}^{-1}$  para HCl (162 °C, por 45 min, com 2,5%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido) e 13,5 g  $\text{L}^{-1}$  para  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (155 °C, por 55 min, com 3,5%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido). No caso da MA, a produção de açúcares fermentescíveis foi de 10,0 g  $\text{L}^{-1}$  para HCl (150 °C, por 45 min, com 0,5%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido) e 13,56 g  $\text{L}^{-1}$  para  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (152 °C, por 55 min, com 2,0%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido). Para a MAR, a produção de açúcares fermentescíveis foi de 8,42 g  $\text{L}^{-1}$  para HCl (150 °C, por 40 min, com 0,5%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido) e 8,45 g  $\text{L}^{-1}$  para  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (140 °C, por 37 min, com 0,5%  $\text{v v}^{-1}$  de ácido).

A fermentabilidade dos hidrolisados foi testada considerando-se o consumo de açúcares (>95%), comprovando a viabilidade da produção de produtos biotecnológicos com valor agregado. Novos experimentos acerca

da fermentabilidade dos hidrolisados serão feitos, visando-se ampliar o conhecimento desta etapa, agregando novas possibilidades e propostas de aproveitamento das biomassas em estudo.

Em linhas gerais, vantagens como a facilitação do ataque à matriz lignocelulósica na etapa subsequente, uso de condições mais brandas de hidrólise, baixo custo de instalação, operação e manutenção, geração mínima de resíduos e redução do número de operações unitárias foram constatados na abordagem utilizada.

A metodologia analítica utilizada foi eficiente na determinação dos açúcares estudados, bem como na determinação de subprodutos, interferentes e concomitantes, no hidrolisado e no fermentado do processo.

Por fim, e tomando por base os resultados otimizados das etapas de hidrólise alcalina e ácida, pode-se afirmar que as biomassas CA, MA e MAR podem fornecer monossacarídeos fermentescíveis e, a partir de então, dar origem a diversos bioprodutos.

Igualmente, pode-se concluir que este trabalho pode ser visto como uma comprovação da viabilidade de emprego de biomassas regionais na geração de produtos com valor agregado. Ademais, no que se refere à CA, a rota produtiva proposta pode contribuir significativamente para a mitigação de um sério problema ambiental de nosso estado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, J. C. *et al.* Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Vol. 1, 61-77, 2014.
- ALVIRA, P. *et al.* Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, Vol. 101, 4851–4861, 2010.
- BEVILAQUA, D. B. *et al.* Cleaner production: levulinic acid from rice husks. **Journal of Cleaner Production**, Vol. 47, 96–101, 2013.
- BEVILAQUA, D. B. *et al.* Sustainable succinic acid production from rice husks. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Vol. 1, 9-13, 2015.
- BINOD, P. *et al.* Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, Vol. 101, 4767–4774, 2010.
- BORGES, F. C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. 2010, 121p. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Área de concentração: Projeto de Processos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.
- CABRAL, M. M. S. *et al.* Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, Vol. 19, 99-108, 2017.
- CANTRELL, K. B. *et al.* Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. **Bioresource Technology**, Vol. 99, 7941–7953, 2008.
- CARDOSO, A. S. The use of microalgae to obtain biofuels. **Brazilian Journal of Biosciences**, Vol. 9, 542-549, 2011.
- CCT. **Coleção de Culturas liofilizadas Fundação André Tosello**. Abertura de ampola e reativação de células liofilizadas (AC-REL-F-002). Campinas, 2015, 6 p.
- CHIU, S-Y. *et al.* Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Vol. 184, 179-189, 2015.
- CHOI, S. *et al.* Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. **Metabolic Engineering**, Vol. 28, 223–239, 2015.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 26 de maio de 2017.
- CUNHA-PEREIRA, F. *et al.* Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Biotechnology**, Vol. 102, 4218-4225, 2011.

DAS, H. & SINGH, S. K. Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry – A Critical Appraisal. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Vol. 44, 77-89, 2004.

DELLA, V. P. *et al.* Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, Vol. 24, No 6, 778-782, 2001.

DEMIRBAS, A. Competitiveliquidbiofuelsfrombiomass. **Applied Energy**, Vol. 88, 17-28, 2011.

DINIZ, J. **Conversão térmica de casca de arroz à baixa temperatura: Produção de bioóleo e resíduo sílico-carbonoso adsorvente**. 2005, 185p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

D'OCA, M. G. M. *et al.* Production of FAMES from several microalgallipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 35, 1533-1538, 2011.

FITZPATRICK, M. *et al.* A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. Review. **Bioresource Technology**, Vol. 101, 8915-8922, 2010.

GALBE, M. & ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Biethanol Production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Vol. 108, 41-65, 2007.

GÁMEZ, S. *et al.* Study of the sugarcane bagasse hydrolysis by using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, Vol. 74, 78-88, 2006.

GHANAVATI, H., NAHVI, I. & KARIMI, K. Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. **Waste Management**, Vol. 38, 141–148, 2015.

GHOSH, S., ROY, S. & DAS, D. Enhancement in lipid content of *Chlorella* sp. MJ 11/11 from the spent medium of thermophilicbiohydrogen production process. **Bioresource Technology**, Vol. 223, 219-226, 2017.

GONZÁLEZ, L. E. *et al.* Biodiesel Production Based in Microalgae: A Biorefinery Approach. **Natural Science**, Vol. 7, 358-369, 2015.

GONZALES, R. R., SIVAGURUNATHAN, P. & KIM, S-H. Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Vol. 41, 21678-21684, 2016.

GONZALES, R. R. *et al.* Enhancement of hydrogen production by optimization of pH adjustment and separation conditions following dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.021, 2017.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.** 2009, 132p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

HUNTLEY, M. E. & REDALJE, D. G. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Vol. 12, 573-608, 2007.

INMETRO – **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/>>. Acesso em junho de 2017.

KARP, E. M. *et al.* Alkaline Pretreatment of Switchgrass. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, Vol. 3, 1479-1491, 2015.

KASSIM, M. A. & BHATTACHARYA, S. Dilute alkaline pretreatment for reducing sugar production from *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. biomass. **Process Biochemistry**, Vol, 51, 1757-1766, 2016.

KIM, J. S., LEE, Y. Y. & KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Vol. 199, 42-48, 2016.

KIM, J. S. *et al.* A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Vol. 199, 42-48, 2016.

KUMAR, G., CHEON, H-C. & KIM, S-H. Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H<sub>2</sub> production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, Vol. 39, 16885–16890, 2014.

Laboratório de Engenharia Bioquímica. **Fotomicrografia da microalga *Chlorella***. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

LI, C. *et al.* Ozonolysis pretreatment of maize stover: The interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. **Bioresource Technology**, Vol.183, 240-247, 2015.

LIM, W-S. & LEE, J-W. Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood. **Bioresource Technology**, Vol. 140, 306–311, 2013.

LINGER, J. G. *et al.* Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Vol. 111, 12013-12018, 2014.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.

MA, Y. *et al.* Comprehensive utilization of the hydrolyzed productions from rice hull. **Industrial Crops and Products**, Vol. 33, 403-408, 2011.

MARGULIS, L. & SCHWARTZ, K. V. **Cinco reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 524 p.

MARTINS, A. F. *et al.* Low temperature conversion of rice husks, eucalyptus sawdust and peach stones for the production of carbon-like adsorbent. **Bioresource Technology**, Vol. 98, 1095-1100, 2007.

MEGAWATI *et al.* Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, Vol. 102, 2062-2067, 2010.

MONTIPÓ, S. *et al.* Building Block Lactic Acid from Rice Husks and Agave Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, Vol. 7, 1495-1507, 2016.

MUSSATTO, S. I. & ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, Vol. 93, 1-10, 2004.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, Vol. 28, 817-830, 2010.

OKUDA, K. Structure and phylogeny of cell coverings. **Journal of Plant Research**, Vol. 115, 283-288, 2002.

OVEREND, R. P., CHORNET, E. & GASCOIGNE, J. A. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, Vol. 321, 523-536, 1987.

ÖZDENKÇI, K. *et al.* A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. **Energy Conversion and Management**, doi.org/10.1016/j.enconman.2017.04.034, 2017.

PALMQVIST, E. A. & HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, Vol. 74, 17-24, 2000.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. *et al.* Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Journal of Cleaner Production**, Vol. 32, 45-51, 2012.

PARAJULI, R. *et al.* Environmental life cycle assessment of producing willow, alfalfa and straw from spring barley as feedstocks for bioenergy or biorefinery systems. **Science of The Total Environment**, Vol. 586, 226-240, 2017.

PARK, J-H. *et al.* Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, Vol. 38, 6130-6136, 2013.

PEDROSO, G. B. *et al.* Building block itaconic acid from left-over biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Vol. 7, 23-35, 2017.



- PEDROSO, G. B. **Produção biotecnológica de ácido itacônico a partir da casca de arroz.** 2014, 112p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.
- PHUKAN, M. M. *et al.* Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, Vol. 88, 3307-3312, 2011.
- PRIMO, T. A. R. C. *et al.* Cultivo de *Chlorella* sp.- Utilização de fertilizantes agrícolas comerciais para a elaboração de meios de cultura. **25º Seminário de Iniciação Científica** – Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.
- RAMBO, M. K. D. *et al.* Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. **Química Nova**, Vol. 36, No 5, 634-639, 2013.
- RASOUL-AMINI, S. *et al.* *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. **Applied Energy**, Vol. 88, 3354-3356, 2011.
- REDDY, N. & YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, Vol. 23, 22–27, 2005.
- REE, R. V. & ANNEVELINK, B. **Status Report Biorefinery 2007.** Agrotechnology and Food Sciences Group. Wageningen: November 2007.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** Boston: CRC Press. ISBN 0-8493- 3240-0, 1990.
- RIDLEY, C. **Can we save the algae biofuel industry?** The Conversation 2016. Disponível em: <<http://theconversation.com/>>. Acesso em 29 de maio de 2017.
- RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, Vol. 34, No. 7, 1242-1254, 2011.
- RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** 2 ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.
- RODRIGUES, P. O. **Ação sinérgica de celulasas e hemicelulasas fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino.** 2016, 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis) – Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri e Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2016.
- ROUX, J-M., LAMOTTE, H. & ACHARD. J-L. An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework. **Energy Procedia**, Vol. 112, 680-688, 2017.
- RUIZ, E. *et al.* Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. **Bioresour. Technol.**, Vol. 140, 292-298, 2013.

- SAHA, B. C. & COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 32, 971-977, 2008.
- SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, Vol. 35, No 5, 1004-1010, 2012.
- SILVEIRA, M. H. L. *et al.* Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. **ChemSusChem**, Vol. 8, 3366-3390, 2015.
- SOARES, B. M. *et al.* Investigation of major and trace element distribution in the extraction–transesterification process of fatty acid methyl esters from microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, Vol. 110, 730-734, 2012.
- SOBRINHO, R. C. M. A. *et al.* FAME Production and Fatty Acid Profiles from Moist *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* Biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 92, 423-430, 2015.
- SOSBAI. **Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado**. Disponível em: <<http://www.sosbai.com.br/>>. Acesso em 26 de maio de 2017.
- TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 9, 1621-1651, 2008.
- TAKEDA, H. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. **Phytochemistry**, Vol. 27, 3823-3826, 1988.
- TRAVAINI, R. *et al.* Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, Vol. 199, 2-12, 2016.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M. *et al.* Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, Vol. 135, 142-149, 2013.
- VASCONCELOS, S. M. *et al.* Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, Vol. 135, 46–52, 2013.
- VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, Vol. 126, 499-507, 2006.
- YEN, H-W. *et al.* Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, Vol. 135, 166-174, 2013.
- ZHANG, Y-H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Vol. 35, 367–375, 2008.

ZHANG, Y-H. P. & LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 88, 797-824, 2004.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol. 41, 1376- 1384, 2015.