

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

**Hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz usando
tecnologias alternativas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Machado Moscon

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz usando tecnologias alternativas

Jéssica Machado Moscon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Cancelier

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**Hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz usando tecnologias
alternativas**

elaborada por
Jéssica Machado Moscon

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador

Adriano Cancelier, Dr. (UFSM)

Marli Comassola, Phd. (UCS)

Juliana R. F. da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 31 de março de 2014.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar nos sonhos que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança...”
(Mais uma vez, Legião Urbana)

DEDICO

A Deus, a meu esposo e meus familiares, por todo amor e carinho.

OFEREÇO

Ao meu esposo Luiz Henrique e ao meu pai Celso que sempre me apoiaram e me deram estruturas para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grande Arquiteto do Universo, que é Deus, pelo merecimento ao dom da Vida;

Ao meu amor e esposo Luiz Henrique pelo companheirismo, carinho e incentivo em todos os momentos durante esses dois anos de mestrado, com certeza ele foi quem mais me incentivou durante esta caminhada;

Aos meus pais Maria Goreti (*in memorian*) e Celso Ricardo por todo o amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Gi, que mesmo distante na maioria do tempo, sempre esteve do meu lado torcendo por mim;

Aos meus sogros, que me acolheram em sua casa como filha e estiveram comigo durante esses dois anos;

Ao meu orientador e professor e como não dizer amigo o Dr. Marcio Antonio Mazutti, por me orientar, me ensinar e me acompanhar em todos os momentos da elaboração dessa dissertação, serei eternamente grata pela ajuda e oportunidade a mim concedida;

Ao meu co-orientador Adriano Cancelier pela orientação;

Aos colegas de laboratório que muito ajudaram durante os experimentos, e também aos demais colegas, pelo companheirismo e amizade durante todo esse período;

Aos amigos e a todos que de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho;

A Universidade Federal de Santa Maria por me proporcionar uma formação de qualidade;

Ao PPGEPro, CNPq e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro;

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE CASCA DE ARROZ USANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS

AUTORA: JÉSSICA MACHADO MOSCON

ORIENTADOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

CO-ORIENTADOR: ADRIANO CANCELIER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de Março de 2014.

A casca de arroz é um resíduo agroindustrial bastante abundante no estado do Rio Grande do Sul, deste modo à mesma vem sendo sugerida e estudada para ser usada como material lignocelulósico em hidrólises para a produção de açúcares fermentescíveis. Entretanto, processos de hidrólises na maioria das vezes não possuem um alto rendimento o que torna o processo ainda mais caro e inviável. Dentro desse contexto o presente trabalho teve o intuito de realizar um estudo onde avaliou hidrólise ácida e enzimática da casca de arroz para a obtenção de açúcares fermentescíveis utilizando algumas tecnologias alternativas, como o banho de ultrassom e CO₂ supercrítico para aumentar os rendimentos de açúcares. Os ensaios foram realizados em diferentes condições de temperatura, concentrações de ácido e umidade, pressão e concentrações de enzima do meio. Na hidrólise ácida convencional obteve-se um rendimento de 113,0 g.kg⁻¹ e na hidrólise ácida assistida por ultrassom o rendimento foi de 162,0 g.kg⁻¹, com base nesses resultados dos rendimentos de açúcares foi possível concluir que o uso do ultrassom intensificou o processo ocorrendo um aumento do rendimento em cerca de 43% quando comparado com o rendimento de açúcares fermentescíveis da hidrólise convencional. Já na hidrólise enzimática utilizando o CO₂ Supercrítico o rendimento foi de 4,2 g.kg⁻¹ enquanto que o rendimento da hidrólise enzimática convencional e assistida por ultrassom foi de 16 g.kg⁻¹, neste caso o uso do CO₂ supercrítico não foi uma alternativa promissora, uma vez que a mesma causou uma desnaturação das enzimas causando uma diminuição na eficiência do processo.

Palavras chaves: casca de arroz, resíduo agroindustrial, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, tecnologia alternativas, ultrassom, CO₂ supercrítico.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Process Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

ACID AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF RICE HULLS USING ALTERNATIVE TECHNOLOGIES

AUTHOR: JÉSSICA MACHADO MOSCON

ADVISER: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

CO-ADVISER: ADRIANO CANCELIER

Defense Place and Date: Santa Maria, March 31th, 2014.

Rice husk is a fairly abundant agro-industrial waste in the state of Rio Grande do Sul, hence the same has been suggested and studied to be used as in lignocellulosic hydrolysis to produce fermentable sugars material. However, processes of hydrolysis in most cases are more expensive and impractical. In this context, this work aimed to study which evaluated acid and enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars using some alternative technologies such as ultrasound and supercritical CO₂ to increase the yields of sugars. In the acid hydrolysis, the yields obtained at optimized conditions were 113.0 and 162.0 g.kg⁻¹ for conventional and ultrasound-assisted hydrolysis, where the yield obtained by ultrasound-assisted hydrolysis was around 43% higher than for the conventional hydrolysis. In the enzymatic hydrolysis, it was evaluated the use of supercritical CO₂ as co-solvent and ultrasound-assisted hydrolysis and the results were compared with conventional procedure. Maximum yield of fermentable sugar obtained was about 16 g.kg⁻¹ using conventional or ultrasound-assisted hydrolyses. The yield obtained in the hydrolysis using supercritical CO₂ as co-solvent was around 4.2 g.kg⁻¹. Enzymatic hydrolysis using conventional procedure showed to be the best alternative to obtain fermentable sugar from rice hulls since the innovative technologies employed did not lead to better results. For acid hydrolysis, it was possible to obtain high yield using less acid and low temperature, in a manner that ultrasound can be used as a device for process intensification.

Key words: rice husk, agroindustrial residue, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, alternative technology, ultrasound, supercritical CO₂.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (SILVA, 2010)..... | 15 |
| Figura 2: Produção de casca de arroz, as colunas verdes estão a produção, e a linha vermelha diz respeito a área ocupada. (PEREIRA, 2014)..... | 16 |
| Figura 3: Constituição da casca de arroz. (PEREIRA, 2014)..... | 17 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Estrutura da dissertação | 13 |
| 1.2 Objetivos | 14 |
| 1.2.1 Objetivo geral..... | 14 |
| 1.2.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 Material lignocelulósico | 15 |
| 2.2 Casca de Arroz como Resíduo Agroindustrial | 16 |
| 2.3 Tecnologias usadas para a Hidrólise de Materiais Lignocelulósicos | 18 |
| 2.3.1 Hidrólise Ácida..... | 18 |
| 2.3.2 Hidrólise Enzimática..... | 21 |
| 2.3.3 Hidrólise Assistida por Ultrassom..... | 23 |
| 2.3.4 Hidrólise utilizando Fluidos Supercríticos..... | 27 |
| 2.4 Considerações acerca do estado da arte | 30 |
| 3 ARTIGO 1: Hydrolysis of rice hulls using phosphoric acid to obtain fermentable sugars using conventional and ultrasound-assisted technologies | 33 |
| 3.1 ABSTRACT | 33 |
| 3.2 Introduction | 34 |
| 3.3 Material and Methods | 35 |
| 3.3.1 Results and Discussion..... | 37 |
| 3.3.2 Conclusions..... | 40 |
| 3.3.3 Acknowledgements..... | 40 |
| 3.3.4 References..... | 40 |
| 4 ARTIGO 2: Enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars using innovative technologies | 49 |
| 4.1 ABSTRACT | 49 |
| 4.2 Introduction | 50 |
| 4.3 Material and methods | 52 |
| 4.3.1 Results and Discussion..... | 54 |
| 4.3.2 Conclusions..... | 57 |
| 4.3.4 References..... | 58 |
| 5 DISCUSSÃO INTEGRADA | 67 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES | 69 |
| 7 REFERÊNCIAS | 70 |

1. INTRODUÇÃO

Caracterizados por um crescimento exacerbado da população e pela exploração indiscriminada dos recursos naturais, observa-se uma clara tendência de esgotamento de recursos. A partir deste fenômeno é possível prever que, em um curto prazo de tempo, isso acarretará a falta de elementos essenciais para a subsistência humana, especialmente alimentos e combustíveis. Com isso, parece claro que a biomassa será, num futuro muito próximo, a principal fonte de recursos tanto para obtenção de alimentos como para a produção de combustíveis (REYES, 1998). Dentro desse contexto, os materiais lignocelulósicos ocupam um lugar de destaque, devido a sua abundância e seu caráter renovável, tais como bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, algumas espécies de madeira, etc (SINGH et al., 2014).

O sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 80% do consumo mundial de energia se origina dessas fontes; o consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (média em 20 anos) e cresceu 3,1% ao ano nos últimos 5 anos (GOLDEMBERG, 2008). Devido a esta situação, a busca por combustíveis alternativos levou alguns países a optar por biocombustíveis. Em termos de Brasil, o principal biocombustível é o etanol produzido pela fermentação de açúcares de cana-de-açúcar. Uma outra via para a produção de etanol é pela hidrólise de biomassa celulósica, com geração de glicose, a qual pode ser fermentada gerando etanol de segunda Geração (OGEDA, 2010).

Segundo Ogeda (2010), a biomassa celulósica é composta por cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações glicosídicas β -1,4) unidas entre si por ligações de hidrogênio, essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemicelulose (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas). As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa, representando em torno de 40-50% e 20-30% do peso seco das plantas, respectivamente, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares fermentados.

A casca de arroz em especial, que foi o resíduo agroindustrial que utilizamos em nosso trabalho, é um resíduo bastante abundante em termos de Brasil sendo ele o segundo maior produtor mundial de arroz, e o estado do Rio Grande do Sul em especial é o maior produtor de arroz no Brasil sendo responsável por cerca de 50% de toda a produção brasileira

(HICKERT, 2010; LORENZETT et al., 2013). O arroz é uma cultura de suma importância e é produzida no mundo todo. Anualmente cerca de 500.000 toneladas de arroz são produzidas no mundo, e para cada quilograma de arroz colhidas cerca de 20-33% de casca de arroz são geradas. A casca de arroz contém 28,6% de celulose, 28,6% de hemicelulose, lignina e 24,4% de 18,4% de matéria extrativa aproximadamente (PORTUMARTHI et al., 2013).

Entretanto, a tarefa de hidrolisar materiais lignocelulósicos ainda é complexa, devido à difícil digestibilidade da celulose e por outros fatores físico-químicos e de estrutura. Dessa forma o pré-tratamento é de suma importância para a obtenção de açúcares fermentescíveis na hidrólise, uma vez que tem como função quebrar a estrutura da lignina e celulose para melhorar o acesso das enzimas na hidrólise. Porém, esta etapa possui uma problemática em relação ao alto custo do processo. Com isso alternativas voltadas para este contexto em combinar as etapas de pré-tratamento e hidrólise em uma única etapa através da utilização de fluidos pressurizados pode ser uma possibilidade (SILVA, 2010; ALVIRA et al., 2010).

Segundo Aguiar (2010), a hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ser feita por via química ou via enzimática. Mesmo que a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e, relativamente, possua um menor custo, gera resíduos poluentes e, na maioria das vezes, produtos que acabam por inibir uma fermentação posterior. Em consequência disso, a sacarificação enzimática tem sido objeto da maioria dos estudos, já que processos enzimáticos oferecem potencial de redução de custos ao longo prazo. A utilização de enzimas em processos industriais muitas vezes pode eliminar o uso de temperaturas elevadas, solventes orgânicos e condições extremas de pH, sendo que, ao mesmo tempo, oferece um aumento da especificidade da reação e da pureza do produto, além de reduzir o impacto ambiental (CHERRY e FIDANTSEF, 2003).

Existem alguns estudos onde apontam a descoberta de que enzimas podem manter a atividade biocatalítica em altas pressões, incentivando o uso sob condições sub e supercríticas. Dessa maneira, o uso de solventes pressurizados pode ser uma maneira interessante para conduzir reações enzimáticas (SILVA, 2011). Outra tecnologia bastante interessante para ser usada em reações de hidrólise é o ultrassom, que na última década surgiu como uma opção de processamento aos tratamentos convencionais em processos de alimentos e de biotecnologia, seus efeitos químicos e físicos surgiram a partir do colapso por cavitação, que produz condições extremas localmente e, portanto, induz a formação de espécies químicas que não são facilmente obtidas em condições convencionais, dirigindo uma reatividade articular, fazendo com que o colapso das bolhas de cavitação e a onda de choque resultante proporcionem uma eficiente agitação aumentando as taxas de reação e, portanto,

tornando-se uma ferramenta útil em reações enzimáticas (SOUZA et al., 2013). Fazendo-se o uso de ultrassom com uma potência apropriada ocorre o aumento a atividade da enzima, intensificando o tratamento enzimático do substrato celulósico, melhorando assim a transferência de massa e difusividades de enzima e substrato (SILVA et al., 2013).

O uso do ácido fosfórico nos últimos anos vem ganhando espaço nas reações de hidrólise de materiais lignocelulósicos, isso devido a inúmeras vantagens tais como a sua toxicidade, o mesmo se trata de um ácido seguro e atóxico, além de ser barato, outra vantagem interessante é que o H_3PO_4 depois da neutralização do hidrolisado com NaOH forma o sal fosfato de sódio, este sal por sua vez pode permanecer nos hidrolisados sendo utilizado depois como nutriente por micro-organismos na fermentação (NEGRO et al., 2014; GÁMEZ et al., 2006).

Outra vantagem da utilização do Ácido Fosfórico esta relacionado com o processo de filtração para a remoção dos sais, utilizando o ácido fosfórico esta etapa é desnecessária, levando em consideração isto no processo o mesmo tende a ter uma melhoria quanto a rendibilidade, gerando um impacto benéfico ao meio ambiente pois o sal formado não será um desperdício (WERLE et al., 2013, GÁMEZ et al., 2006).

Uma maneira interessante de se obter rendimentos melhorados seria intensificar o processo com o uso da energia ultrassônica, isto foi observado no trabalho de hidrólise ácida com ácido fosfórico da folha da palmeira onde o autor obteve um rendimento de 74% de açúcar com o uso do ultrassom enquanto que sem o ultrassom o rendimento foi de 68% (WERLE et al., 2013).

1.1 Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada na forma de artigos científicos. O capítulo dois apresenta a *Revisão Bibliográfica* desse trabalho, que aborda as informações técnicas necessárias à compreensão e ao embasamento do estudo. No capítulo três encontra-se o artigo intitulado *Hydrolysis of rice hulls using phosphoric acid to obtain fermentable sugars using conventional and ultrasound-assisted technologies*, referente aos resultados da primeira parte experimental do trabalho, que abrange a hidrólise ácida da casca de arroz utilizando o banho de ultrassom, fazendo nele uma avaliação dos efeitos da hidrólise ácida convencional e hidrólise ácida com banho de ultrassom. O capítulo quatro apresenta o segundo artigo, intitulado *Enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars using innovative technologies* com os resultados da segunda parte experimental do trabalho, onde são avaliados e comparados os efeitos da hidrólise enzimática utilizando CO_2 Supercrítico. No capítulo

cinco será realizada uma discussão de forma integrada, onde se procura relacionar os resultados dos dois artigos apresentados anteriormente. No sexto capítulo serão apresentadas as considerações finais, onde estão descritas as principais conclusões obtidas no decorrer do trabalho. O sétimo capítulo apresenta sugestões para o desenvolvimento dos próximos trabalhos e, no último capítulo, estão identificadas as referências bibliográficas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente trabalho foi realizar hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz utilizando tecnologias alternativas, como ultrassom e CO₂ supercrítico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar hidrólise ácida e enzimática da casca de arroz por processo convencional;
- Realizar hidrólise ácida e enzimática da casca de arroz utilizando o banho de ultrassom;
- Avaliar a hidrólise enzimática de casca de arroz usando o CO₂ supercrítico como meio reacional;
- Comparar os rendimentos de açúcares fermentescíveis das hidrólises da casca de arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica procurou abordar, inicialmente, os aspectos relacionados à composição do material celulósico, dando ênfase para o resíduo utilizado no trabalho que foi a casca de arroz. Após será apresentado o estado da arte para as tecnologias avançadas usadas na dissertação, que são os fluidos supercríticos e ultrassom e, por fim, uma explanação sobre hidrólise ácida assistida por ultrassom e hidrólise enzimática utilizando CO₂ supercrítico.

2.1 Material lignocelulósico

A composição dos resíduos lignocelulósicos é muito variável, pois os constituintes possuem características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da sua espécie e de suas condições de crescimento. A biomassa lignocelulósica é composta de celulose (~35-50%), hemicelulose (~20-35%), lignina (~10-25%), além de pequenas quantidades de outros componentes (extrativos) (~5-20%) (RABELO, 2007), sua estrutura pode ser observada na Figura 1 .

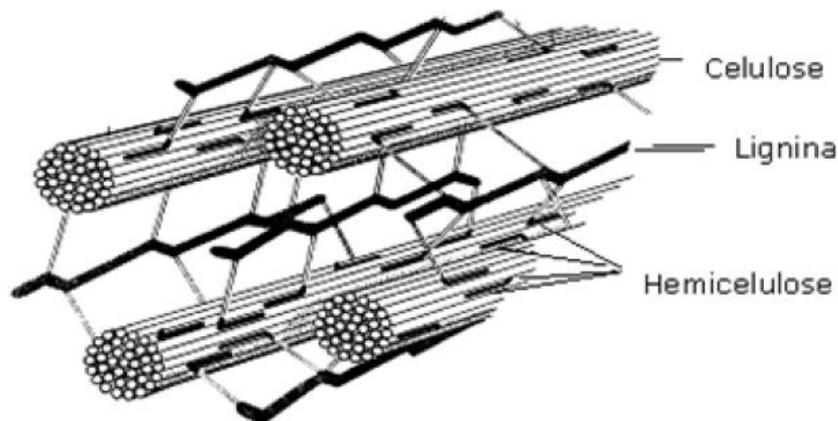


Figura 1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (SILVA, 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol é uma oportunidade valiosa para a segurança energética, além de reduzir o déficit comercial e a emissão dos gases responsáveis pelo efeito estufa (SINGH et al., 2014). Há uma crescente preocupação com as enormes

quantidades de resíduos agroindustriais, como casca de arroz que, devido à disposição inadequada, estão causando danos ao meio ambiente (BELIVAQUA et al., 2014).

Existem inúmeros resíduos agrícolas disponíveis para usar na conversão da biomassa, tais como o bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, algumas espécies de madeira, palha de arroz, palha de trigo, entre outros (SINGH et al., 2014). O aumento das áreas de plantio afeta o ambiente de forma considerável devido ao montante desses resíduos acumulado no meio ambiente em decorrência da produção agrícola excessiva, além de representarem também uma perda potencial de recursos energéticos, uma vez que são passíveis de biotransformações, podendo ser usados como fontes de combustíveis (HICKERT, 2010).

2.2 Casca de Arroz como Resíduo Agroindustrial

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz constituem fontes renováveis, abundantes e de baixo valor econômico, disponíveis para a biotransformação em produtos com valor agregado (MONTIPÓ et al., 2013). Nas últimas décadas tem se visto uma atenção especial em relação à casca de arroz, já que a mesma existe em grande quantidade e é livre para a utilização (HELLO et al., 2014; JOHAR et al., 2012). O arroz cujo nome científico é *Oryza sativa* é um cereal explorado por todos os continentes e consumido em todo o mundo, destacando-se por estar presente na dieta básica de quase toda a população, fazendo parte da base alimentar tanto de regiões desenvolvidas como nas em desenvolvimento (CECHIN et al., 2013). Na figura a seguir, encontra-se a produção global de arroz com casca.

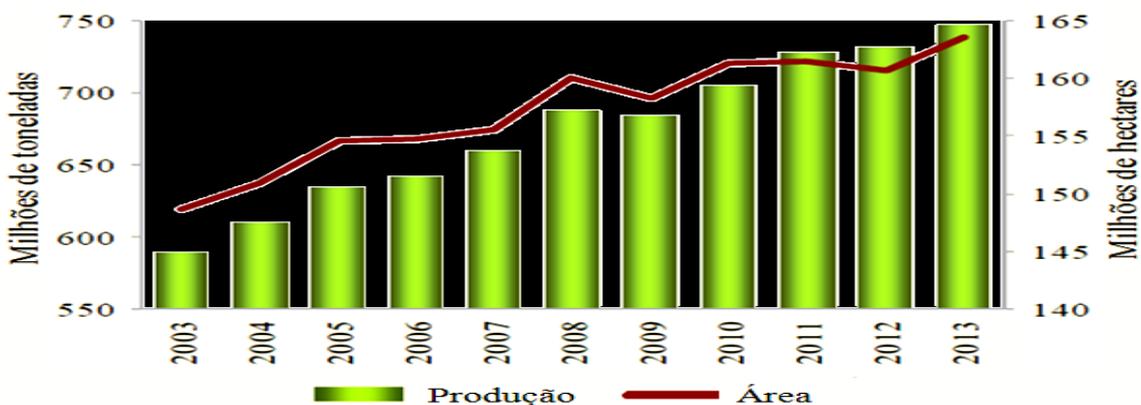


Figura 2: Produção de casca de arroz, as colunas verdes estão a produção, e a linha vermelha diz respeito à área ocupada. (PEREIRA, 2013).

Segundo Lorenzetti et al., (2012), o Brasil, em especial o estado do Rio Grande do Sul, é um grande produtor de arroz a nível mundial. Esse grão é um alimento de grande potencial, ocupando um lugar especial na mesa dos brasileiros. Para que esse alimento possa chegar à mesa de todos os brasileiros é preciso que seja produzido em grande escala e posteriormente seja beneficiado, ou seja, é preciso descascar e tratar o grão em indústrias de beneficiamento para que ele possa, só então, ser encaminhado ao comércio para venda ao consumidor final. Entretanto, nesta fase onde esse produto é beneficiado e classificado, além do arroz, também são gerados muitos resíduos, onde a casca do arroz se destaca, principalmente devido ao grande volume gerado e pela demora para absorção natural quando lançada no meio ambiente.

Segundo o terceiro prognóstico de produção para o arroz em casca divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indica uma colheita de 12.254.085 toneladas na safra 2013/14, o que representará aumento de 4,2% sobre a temporada 2012/13, sendo assim o estado do Rio Grande do Sul, maior produtor nacional, contribuirá com 69,1% da produção do cereal (PLANETA ARROZ, 2014).

Outra proposta com objetivos bastante interessantes que está sendo estudada no Rio Grande do Sul é o uso do arroz para a produção de etanol com a construção de grandes unidades industriais, a partir desta notícia é possível observar o grande foco que está voltado para o uso do arroz para diferentes finalidades, dentre as mais vistas estão à produção de etanol a partir do grão e dos resíduos do grão (NOVA CANA, 2013).

A composição da casca de arroz geralmente apresenta teor de cinza na faixa de 13,2 a 21%, essas cinzas por sua vez são constituídas basicamente de 80 a 90% de sílica (SiO_2) e o restante da composição são compostos inorgânicos. Entretanto os componentes orgânicos principais presentes na casca de arroz são a celulose, a hemicelulose e a lignina, representando um teor de 34,5 a 45,9%. O material restante é composto por proteínas, carboidratos e gorduras. Dentre as características da casca de arroz, podemos citar a sua fibrosidade, a abrasividade e o baixo teor de nutriente na sua composição (PINTO e CALLONI e SILVA, 2013). Segue a figura, com a constituição da casca de arroz.

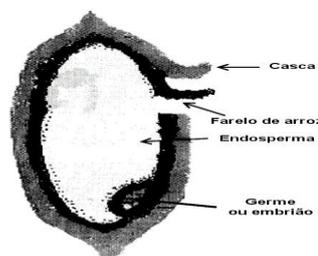


Figura 3: Constituição da casca de arroz (PEREIRA, 2013).

A casca de arroz é um subproduto da indústria de moagem de arroz, e representa cerca de 20% em peso bruto de arroz. A mesma contém uma elevada concentração de celulose aproximadamente de 40 a 60%, e é um resíduo amplamente disponível a um custo relativamente baixo. Devido a sua natureza recalcitrante, a conversão direta de casca de arroz geralmente resulta em baixo rendimento do produto (SHI et al., 2013; HUANG et al., 2013). Devido a esse fator, é necessário realizar o pré-tratamento para poder interromper parcialmente a estrutura recalcitrante para alcançar deslignificação da biomassa lignocelulósica, tornando desta maneira o substrato sólido mais acessível à enzima ou microrganismo durante a bioconversão (ANG e CHENG e CHUA, 2013).

A casca de arroz, portanto pode ser hidrolisada em açúcares, onde cerca 0,426 g de açúcares por 1 g de casca de arroz seco, sendo possível obter até 0,21 g de etanol por 1 g de casca de arroz seco. Porém, devido à estreita associação de celulose e hemicelulose com lignina na parede celular da planta, um pré-tratamento é necessário para fazer esta hidrólise enzimática e fermentação (SINGH e BAJAR e BISHNOI, 2014).

2.3 Tecnologias usadas para a Hidrólise de Materiais Lignocelulósicos

O pré-tratamento no processamento dos materiais lignocelulósicos é essencial. Dessa forma devemos considerar desde a liberação de açúcares e até a digestibilidade dos sólidos, pois o processo deve ser considerado como um todo. Além disso, devem ser considerados na sua escolha a matéria-prima, enzimas e microrganismos utilizados no processo global (LINHARES et al., 2014). A hidrólise da celulose pode ser conseguida através da utilização de enzimas, ou por ácidos diluídos e concentrados (HELLO et al., 2014; CASTRO, 2010).

2.3.1 Hidrólise Ácida

A hidrólise catalisada por ácido diluído ou concentrado tem sido amplamente utilizada para quebrar polímeros de celulose e hemicelulose da biomassa celulósica para formar moléculas de açúcar individuais que podem ser fermentados em etanol (OROZCO et al., 2011). A hidrólise ácida pode ser conduzida utilizando vários ácidos, tais como o ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido nítrico. Segundo Sing et al., (2014) em seu artigo de revisão muitos estudos tem mostrado que o uso do ácido no pré-tratamento aumenta a hidrólise da hemicelulose.

A hidrólise ácida com ácido diluído de materiais lignocelulósicos é um processo atraente devido às inúmeras vantagens que oferece sobre hidrólise com ácido concentrado. A primeira delas é devido aos níveis mais baixos de corrosão associadas com a diluição dos ácidos (OROZCO et al.,2014).

Tem-se conhecimento que o ácido sulfúrico é mais corrosivo para o aço inoxidável do que o ácido fosfórico. (OROZCO et al., 2014). Sabe-se também que os sais de fosfato obtidos a partir da neutralização da reação de pós do ácido fosfórico, são na maioria das vezes utilizados como tampões em processos de fermentação. Outra vantagem de se usar o H_3PO_4 é que, após a neutralização com NaOH, o mesmo gera fosfato de sódio que permanecem no hidrolisado e, posteriormente, são utilizados como nutriente por microrganismos em meios de fermentação (NEGRO et al., 2014). Além disso, o ácido fosfórico é seguro, não tóxico, e barato quando comparado com os outros ácidos. (ZHANG et al., 2010, LINHARES et al., 2013). Outra desvantagem do ácido sulfúrico é em relação à corrosão que o mesmo causa nos equipamentos e o grande desperdício de água usada para neutralizar a hidrólise (LI et al., 2014).

Porém, a hidrólise com ácido diluído apresenta muita complexidade devido o substrato estar na fase sólida e o catalisador estar na fase líquida. O mecanismo da reação de hidrólise com ácido diluído é basicamente essa, primeiramente tem-se a difusão dos prótons através da matéria lignocelulósica úmida, logo em seguida acontece a protonação do oxigênio de uma ligação éter- heterocíclico entre os monômeros de açúcar após isso, acontece à quebra da ligação de éter ocorrendo à liberação de um carbocátion intermediário, ocorre então a solvatação do carbocátion com a água, após tem-se a regeneração do próton com a cogeração do monômero de açúcar ou oligômero ou ainda polímero, isso vai depender da posição que a ligação éter estiver, ocorrido isto vem a fase de difusão dos produtos na fase líquida acontecendo o início da segunda etapa. (VÁZQUES et al., 2007)

Vasconcelos et al.,(2013), realizou um estudo onde fez a investigação do uso do ácido fosfórico no pré-tratamento do bagaço de cana, o autor obteve alta solubilização da hemicelulose no pré-tratamento ácido do bagaço de cana a uma temperatura de 186 °C, concentração de ácido fosfórico de 0,20% durante 8 e 24 min, atingindo solubilização de 96% e 98%, respectivamente. O autor constatou também que o ácido fosfórico remanescente no hidrolisado fornece fósforo que por sua vez é um nutriente para ser usado na fermentação.

Ishola e Isroi e Taherzadeh (2014) avaliaram em seu estudo o efeito do pré-tratamento de fungos e de ácido fosfórico para a produção de etanol a partir dos resíduos de uma indústria de óleo de palma (OPEFB), esses resíduos são obtidos partir do fruto de Dendê uma fruta típica da Ásia conhecida também como fruto de Palma, onde obteve-se um rendimento mais alto quando utilizou o ácido fosfórico no pré-tratamento o rendimento foi cerca de 89,4%.

O ácido fosfórico também foi utilizado para o pré-tratamento do poliéster, onde observou que o mesmo foi potencialmente benéfico para a separação de poliéster a partir de resíduos têxteis, após isso fez-se a sacarificação enzimática da celulose regenerada (SHEN et al., 2013).

Outro trabalho que usa o ácido fosfórico no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é dos autores Kim e Mazza (2008) onde analisaram o uso do ácido para a produção de açúcares do resíduo de cana de linho que é um resíduo com alto potencial para ser convertido em bioetanol, os autores observaram que o nível de ácido fosfórico afeta a digestibilidade mais significativamente quando comparado com outras variáveis avaliadas, foi realizado a otimização do processo tendo uma digestibilidade na faixa de 94,8 %, a partir dos resultados sugere-se então que o uso do H_3PO_4 é um método eficaz para as plantas perenes , bem como madeira dura .

Entretanto existem trabalhos publicados que mostram como se comporta o ácido fosfórico na hidrólise de materiais lignocelulósicos. O autor Orozco et al.,(2014) realizou hidrólise de aparas de madeira de pinheiros um tipo de resíduo lignocelulósico urbano que são provenientes de madeiras, o autor usou o ácido fosfórico para obtenção de açúcares, ele obteve bons rendimentos de açúcares uma mistura de xilose manose e, galactose na faixa de 100% nas condições de 2,5% de concentração de H_3PO_4 a um temperatura de 174°C com um tempo de reação relativamente rápido de 10 minutos, porém obteve um rendimento médio de glicose de 30% com 5% de concentração de ácido a 200° C e tempo de reação de 10 minutos, o autor observou que ocorreu um aumento do rendimento de xilose com o aumento da temperatura e concentração de ácido do sistema.

Outro trabalho bastante interessante encontrado foi dos autores Werle et al., (2013) que também usou o ácido fosfórico para hidrolisar folhas de palmeira para obtenção de açúcares, ele usou o ácido fosfórico nas concentrações de 5 a 20% em peso variando a temperatura na faixa de 30 e 65°C. Foram obtidos neste estudo rendimento mais alto quando usou o ácido na concentração de 12,5%. Observou-se também a partir da análise estatística

que o ácido fosfórico foi importante na taxa de cinética nas fases iniciais da reação enquanto que a temperatura foi mais importante na efetividade global do processo.

Encontrou-se na literatura também um trabalho onde o autor realizou a hidrólise da palha de sorgo para obtenção de substâncias furfurais e açúcares utilizando o ácido fosfórico no processo, o autor obteve rendimentos de 13,7 g de substância furfural / L, 4,0 g de xilose / L, 2,9 g / L de glicose, e 1,1 g arabinose / L e 1,2 g de ácido acético / L nas condições experimentais de 134° C usando uma concentração de ácido fosfórico de 6% com um tempo de reação de 300 minutos, a partir destes resultados obtidos no trabalho o autor concluiu que o uso do H₃PO₄ como catalisador é uma alternativa interessante para obtenção das substâncias citadas. (VÁSQUEZ et al., 2007).

2.3.2 Hidrólise Enzimática

A catálise enzimática quando comparada com os catalisadores tradicionais tem vantagem, pois as enzimas são reutilizáveis e potencialmente mais compatíveis com as variações na qualidade da matéria-prima (PEREIRA, 2013). A hidrólise de polissacarídeos é geralmente catalisada por enzimas hidrolíticas. As celulases são mistura de pelo menos três enzimas diferentes: endoglucanase (EG, endo -1,4 -D -glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4), que ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, e tem-se a criação de extremidades livres de cadeia; exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4- beta-D- glucana celobiohidrolase, ou EC 3.2.1.91), que degradam a molécula removendo unidades de celobiose das cadeias de extremidades livres; e β -glucosidase (EC 3.2.1.21) que leva à produção de celobiose da glicose. A glicose e xilose são os dois açúcares dominantes após sacarificação. (SINGH e BAJAR e BISHNOI, 2014).

As enzimas do complexo celulásico não hidrolisam a celulose de modo muito eficiente, pois é necessário que haja uma atuação sinérgica complementar, isso quer dizer que é preciso que aconteça uma ação em conjunto para que o rendimento da celulase simultaneamente seja melhor do que a soma de todos os rendimentos individuais. Dessa forma tem-se o conhecimento de três formas de sinergia (SILVA, 2010).

1. a sinergia endo-exo onde as endoglucanases atuam nas regiões amorfas, liberando terminais redutores e não redutores, nas quais atuaram as celobiohidrolases do tipo I e do tipo II respectivamente;

2. Sinergia exo-exo as celobiohidrolases do tipo I e II ou seja as redutoras e não redutoras vão atuar simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases;
3. Sinergia exo- BG e endo- BG onde as exoglucanases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos da β -glucosidase.

A utilização de celulases na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como metalúrgico, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres.

A hidrólise enzimática da celulose e conversão dos açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol, podem ser conduzidas de forma sequencial (processo HSF, hidrólise separada da fermentação) ou simultânea (SSF, sacarificação simultânea à fermentação) (CASTRO, 2010). A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases e este processo tem como produtos açúcares redutores, incluindo a glicose. Durante a reação enzimática, podem-se destacar os seguintes fatores relacionados ao comportamento das enzimas (RABELO, 2007; SILVA 2010):

- Inibição retroativa das celulases, devida ao acúmulo do produto final de hidrólise no meio de reação (glicose e celobiose);
- Inativação das enzimas pelo efeito prolongado da temperatura e agitação;
- Adsorção inespecífica e/ou não produtiva de um ou mais componentes enzimáticos sobre complexos lignina-carboidrato (hemicelulose e lignina);
- Concentração de enzima;
- Tempo de duração da hidrólise;
- pH do meio.

A atividade catalítica das enzimas é bastante dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, contudo, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: sendo que o primeiro efeito é o aumento da taxa de reação, como se observa na maioria das reações químicas; já o segundo efeito a acontecer está

relacionado com a estabilidade da proteína, onde a mesma decresce devido à desativação térmica. O aumento da atividade é chamado de ativação pela temperatura e a redução é chamada de inativação pela temperatura ou desnaturação térmica. Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, isto é, a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo (FURIGO Jr., 2001).

Outro fator que afeta positivamente a hidrólise enzimática da celulose, sendo isto uma regra, é a concentração enzimática, que aumenta a taxa de hidrólise até uma concentração limite, a partir da qual não é compensatório continuar adicionando enzimas ao processo, devido aos sítios da matriz do substrato já se encontram saturados pelos biocatalisadores (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

Em relação à hidrólise enzimática foram encontrados na literatura trabalhos que avaliavam o uso do pré-tratamento do material lignocelulósico antes de realizar a hidrólise enzimática. Em um desses trabalhos os autores avaliaram o uso do pré-tratamento ácido para a fruta de *Jatropha curcas* que também é conhecido como Pinhão Manso este por sua vez é fonte de óleo para a indústria de biodiesel, as conversões de celulose acima de 80 % foram obtidos tanto na hidrólise enzimática realizada separada e na sacarificação simultânea e fermentação dos materiais pré-tratados. Entretanto o autor obteve conversões ótimas na fermentação em estado sólido quando foi realizado o pré-tratamento a baixa temperatura de 136 ° C e concentrações moderadas de ácido de 1.5 % e tempo de reação de 30 minutos, o autor concluiu dessa forma que a inclusão de um passo de extração anterior ao pré-tratamento revelaram uma melhoria adicional da conversão enzimática da celulose (GARCÍA et al., 2014).

Ferreira et al.,(2013) realizou hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz para avaliar quais dos métodos daria melhores resultados de açúcares redutores, o autor concluiu que a hidrólise ácida apresentou baixos valores quanto a produção de açúcares redutores, a mesma foi realizada em condições brandas de temperatura e em concentrações fracas de HCl, porém a hidrólise enzimática apresentou-se mais eficiente, finalizando a hidrólise ácida apresentou valores pequenos cerca de 20 vezes menores que os valores de açúcares redutores do que método enzimático.

2.3.3 Hidrólise Assistida por Ultrassom

O ultrassom é onda sonora em uma frequência fora do alcance do ouvido humano (> 20 kHz). Ele pode ser classificado em duas categorias: ultrassom de baixa frequência que varia de 20-100 kHz; 10-1000 W/cm²) e ultrassom de alta frequência que varia de 2-20 MHz; <10 W/cm²). Com as vantagens de ser seguro, não tóxico e ambientalmente correto, o ultrassom tem sido universalmente utilizado para processamento, e extração na indústria de alimentos. Nos últimos anos, o ultrassom vem sendo utilizado como uma alternativa eficaz para ativar ou desativar as enzimas em produtos alimentares. (YU et al., 2014; SHI et al., 2013).

A irradiação ultrassônica é uma ferramenta útil para melhorar a transferência de massa em sistemas heterogêneos por meio de forças mecânicas, e por efeitos térmicos ou por meio de cavitação que consiste em processo dinâmico típico de bolhas cavitacionais, onde numerosas microbolhas contendo vapores de solventes são gerados em movimento radial, onde a energia acústica se propaga no meio líquido. A irradiação ultrassônica pode, até certo ponto, neutralizar o efeito da alta viscosidade sobre as reações, e também podem ser utilizados para a intensificação da atividade enzimática (ZHANG et al., 2014; SUBHEDAR, e GOGATE, 2014; LUO e FANG e SMITH JR, 2014; REHMANA et al., 2013; BOATENG e LEE, 2014).

Sendo a cavitação o principal mecanismo de intensificação de ultrassom, entretanto para ter uma aplicação eficiente de ultrassom é necessário que se tenha o controle e seleção da intensidade energética e população de cavitação ativa. A intensidade energética da cavitação depende do comportamento médio das bolhas, enquanto que a população de cavitação ativa determina a eficiência cavitacional. (LUO e FANG e SMITH JR, 2014).

O ultrassom fornece um ambiente físico especial para os sistemas de processamento de biomassa. O impacto de alta energia e à corrosão por ultrassom de alta intensidade para o sistema contribui para facilitar o pré-tratamento, fracionamento e reações químicas dos materiais da biomassa, sob condições suaves resulta em um aumento da eficiência da reação e maior atividade catalítica. A aplicação do ultrassom intensifica a transferência de massa e calor em reações e, portanto acelera a taxa de reação ou altera a cinética (LUO e FANG e SMITH JR, 2014).

Cavitação é o principal mecanismo de intensificação de ultrassom. Para ter uma aplicação eficiente de ultrassom é necessário que se tenha o controle e seleção da intensidade energética e população de cavitação ativa. A intensidade energética da cavitação depende do comportamento médio das bolhas, enquanto que a população de cavitação ativa determina a eficiência cavitacional (LUO e FANG e SMITH JR, 2014).

Segundo os autores Luo e Fang e Smith Jr (2014), existem três requisitos básicos para a conversão da lignocelulose, o primeiro está relacionado com o pré-fracionamento da matéria lignocelulósica onde deve ser removido a lignina e a hemicelulose, pois essas estruturas atrapalham o acesso das moléculas de enzima e catalisadores químicos dificultando a hidrólise do material lignocelulósico, o segundo requisito trata da cristalinidade da celulose, e o terceiro está relacionado a intensificação da transferência de massa em reações heterogêneas, contendo lignoceluloses sólidas. A superfície da lignocelulose precisa ser aumentada através de pré-tratamento para melhorar o contato com solventes para reações.

O uso do ultrassom na hidrólise ácida causa um aumento no rendimento da hemicelulose em xilose, isso acontece devido ao aumento da energia ultrassônica, bem como o aumento da duração do banho de ultrassons durante tratamento, pois ambos influenciam significativamente a eficiência de hidrólise, isso foi observado em um estudo avaliando o efeito do ultrassom na hidrólise ácida de resíduos de uma indústria de óleo de palma (OPEFB) usando temperaturas baixas, os autores utilizaram ácido sulfúrico a 2 % e temperatura de 100 °C eles obtiveram um teor máximo de xilose de 58 % a partir da fibra OPEFB utilizando o ultrassom a 90 % de amplitude durante 45 min, quando o processo foi realizado na ausência de ultrassom apenas 22 % da xilose foi obtida. Não foi observado aumento substancial da formação de xilose por hidrólise ácida a temperaturas mais altas de 120 e 140 °C (YUNUS R et al., 2010).

O uso do ultrassom em reações de hidrólise enzimática é necessário que se tenha um cuidado especial, pois as condições combinadas de calor e sonicação devem ser cuidadosamente controladas para evitar a perda das atividades enzimáticas (LUO e FANG e SMITH JR, 2014). O uso do ultrassom pode ser usado para intensificar reações enzimáticas, o mesmo sugere que a atividade de α -amilase, papaína e pepsina, pode ser modificada por tratamento de ultrassons, principalmente devido à variação das suas estruturas secundária e terciária (YU et al., 2014). Outro autor observou que o uso do ultrassom de baixa frequência teve um efeito positivo sobre a atividade da enzima celulase (SUBHEDAR e GOGATE, 2014).

Os resultados apresentados por Shi et al., (2013), mostram que o uso do ultrassom no pré-tratamento notavelmente mudou as estruturas de casca de arroz causando um reforço no inchaço na área de superfície, destruindo a estrutura da lignina causando dessa forma uma maior exposição da celulose e hemicelulose. Foi obtido um maior rendimento de bio-óleo de 42,8 %, a partir da conversão termoquímica a 300 °C e 0 min de tempo de residência para a 1 h de pré-tratamento da casca de arroz.

No último ano alguns trabalhos foram publicados utilizando a tecnologia de ultrassom em hidrólises ácida e enzimática, mostrando inúmeras vantagens e excelentes resultados quando se tratava de hidrólise de matérias lignocelulósicas.

No trabalho de Souza et al., (2013) avaliou-se a atividade de amilase comercial sob a irradiação de ultrassom. Os autores observaram que ocorreu um aumento significativo na atividade da enzima, cerca de 3 vezes mais elevado quando a temperatura era 40°C, confirmando, desta maneira, que a irradiação de ultrassom é uma tecnologia promissora para ser utilizada na reação enzimática, devido aos seus efeitos positivos sobre a atividade da enzima.

Ultrassom também intensificou a liberação de açúcares fermentáveis na hidrólise de folhas de palmeira (WERLE et al., 2013). O uso do ultrassom combinado com fluidos supercríticos apresentou excelentes resultados no aumento da atividade enzimática (SILVA et al., 2013, BENAZZI et al., 2013).

O uso do ultrassom no processo de sacarificação e fermentação simultânea foi realizado para folhas de palmeira obtendo resultados para a produção de bioetanol, segundo o autor o uso do ultrassom em processos industriais é capaz de reduzir a temperatura do processo e o tempo de reação ocorrendo dessa forma uma melhora na utilização de energia para a produção sustentável. De acordo com este estudo realizado o ultrassom melhorou o rendimento de etanol de forma significativa em tempos mais curtos, o autor realizou também a otimização do processo obtendo resultados em concentração máxima de bioetanol de 18,2 g / L e rendimento de 57,0 % em 5 h de reação com temperatura de 40 ° C e pH na faixa de 5,0 e concentração de levedura 15 g / L e de carga sólida 10 % w / v. (BOATENG e LEE, 2014) .

O uso do ultrassom foi usado também na hidrólise enzimática de resíduos de mandioca para a obtenção de açúcares fermentáveis, o autor observou um aumento no rendimento de açúcar fermentável com o uso da tecnologia de ultrassom, os melhores rendimentos de açúcares redutores liberados foram 116,1 g.L⁻¹ com ultrassom e 83,1 g.L⁻¹ sem ultrassom, obtido no sólido a proporção líquido de massa de 0,4 %, e as concentrações de amiloglucosidase e α -amilase foram 12,2 e 8,0 % em massa . O valor médio de açúcar redutor total na produção foi de 0,22 e 0,31 g.g⁻¹ na ausência e na presença de irradiação de ultrassom, portanto a eficiência da hidrólise foi 60 e 82 %, respectivamente (LEAES et al., 2013).

O autor Yang et al., (2012) utilizou o ultrassom no tratamento da casca de arroz para a produção de oligossacarídeos utilizando a enzima celulase, o autor obteve resultados

interessantes quanto ao rendimento de hemicelulose já que o mesmo foi aumentado cerca de 1,4 vezes, tendo seu tempo de fermentação reduzido de 24 horas para 1,5 horas a uma temperatura de 80°C e utilizando uma frequência de 300 KHz.

Tem-se também o uso desta tecnologia de ultrassom no pré-tratamento da cevada utilizando a enzima α -amilase, o autor conduziu todos os experimentos a uma frequência de 20 KHz, e variou a temperatura de 30 a 70°C, o autor observou que o aumento da temperatura causou uma diminuição na atividade da enzima, com base nos conhecimentos em função do tratamento térmico o autor concluiu que com um gradiente de temperatura elevado conduziu a inativação térmica da enzima ou pirólise das ligações na proteína. O autor avaliou também o efeito da potência acústica na atividade da enzima, observando que a atividade enzimática diminuiu com o aumento das potências acústicas (YALDAGART et al., 2008).

Pablo Resa e Vitaly Buckin (2011) usou ultrassom na hidrólise enzimática de celobiose, utilizando a enzima β -glucosidase, o autor conclui que o uso dessa tecnologia de ultrassom é uma ferramenta interessante no que diz respeito ao monitoramento de reações e análise de enzima.

2.3.4 Hidrólise utilizando Fluidos Supercríticos

A extração supercrítica vem sendo reverenciada e utilizada com sucesso para a extração de diversos materiais com interesse comercial tanto na química como na engenharia de alimentos ou na indústria farmacêutica, devido a sua rapidez em seu processo e o baixo custo com solventes (CALHEIROS, 2007).

Tem-se conhecimento que os primeiros usos da tecnologia de extração supercrítica na indústria apareceram na Alemanha nos anos de 1970 (MOORE et al., 1994).

Fluidos supercríticos se apresentam como tecnologia interessante para a utilização na hidrólise da biomassa como uma alternativa aos solventes convencionais. Os fluidos supercríticos possuem propriedades físico-químicas exclusivas por causa de sua dualidade entre o gás líquido e puro. Entretanto a grande importância dos mesmos é que estas propriedades podem ser ajustadas nas condições de operação que permitem obter um coeficiente de difusão alto, além de um elevado poder de solvatação, e elevado grau de seletividade e fácil separação do solvente (TORO et al., 2014; PORTO et al., 2014).

As propriedades mais interessantes dos fluidos supercríticos são a viscosidade e sua densidade, pois a baixa viscosidade permite que haja penetração do solvente na matriz sólida,

enquanto que a densidade elevada do fluido supercrítico auxilia na solubilização dos compostos (SHARIF et al., 2014).

A escolha do solvente em síntese enzimática é um dos fatores mais importantes em biocatálise, pois na maioria das vezes as características do solvente orgânico influenciam na transferência de massa no sistema de reação, e também tem influência sobre a estrutura da enzima (PEREIRA, 2013). Dióxido de carbono supercrítico é o solvente mais comum utilizados nos processos de extração devido a sua leve de temperatura e pressão críticas (304,2 K e 7,4 MPa) (TORO et al., 2014).

O dióxido de carbono supercrítico tem muitas vantagens tais como quando em solução aquosa ocorre a formação do ácido carbônico, o que favorece a hidrólise dos polímeros. As moléculas de CO₂ são tão pequenas e comparadas ao tamanho da água e da amônia e eles podem penetrar da mesma maneira nos pequenos poros da lignocelulose. Isto é facilitado pela pressão elevada. Após a libertação explosiva de pressão de CO₂, faz acontecer uma perturbação na estrutura da celulose e hemicelulose e conseqüentemente ocorre um aumento do tamanho da área de superfície acessível do substrato ao ataque enzimático (ALVIRA et al., 2010; MOOD et al., 2013).

Pode-se dizer então que a extração supercrítica quando comparada com os outros métodos apresenta como vantagens mais comuns a questão do solvente, pois o mesmo pode ser facilmente removido através da redução da pressão do sistema, os compostos mais sensíveis são extraídos com temperaturas mais baixas. Portanto a eficiência do uso do fluido supercrítico é devido à baixa viscosidade do solvente, alta difusividade e como consequência disso gera uma alta solubilização (MELO, 2013).

Outras vantagens interessantes que podem ser citadas referentes ao CO₂ supercrítico é quanto a sua temperatura crítica de 31,04°C e pressão crítica de 73,8 bar o que são mais fáceis para manuseio de trabalho, pois tem custos mais baixos para a compressão e aquecimento, além de ser um solvente inerte não oferecendo riscos de oxidações reduções e degradações químicas é totalmente seguro não corrosivo não inflamável e não tóxico e tem disponibilidade em alto grau de pureza. Por fim devido a esta característica de versatilidade é possível fazer uma adequação das condições sistema (CALHEIROS, 2007).

O dióxido de carbono (CO₂) é usado para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. O método baseia-se na utilização de CO₂ como um fluido supercrítico, fluido no qual se encontra no estado gasoso comprimido a temperaturas acima do seu ponto crítico e densidade de um líquido. O uso dos fluidos supercríticos no pré-tratamento ou diretamente na

hidrólise são utilizados para deixar a celulose mais acessível para o tratamento aumentando assim a digestibilidade do substrato (ALVIRA et al., 2010).

O tratamento com o CO₂ Supercrítico na atividade da enzima, a estabilidade e a atividade das mesmas expostas a dióxido de carbono sob alta pressão dependem da espécie enzimática, o conteúdo de água na solução e também da pressão e temperatura no sistema de reação. O fator mais importante que pode causar perda de atividade da enzima é o passo de depressurização, ou seja, em uma aplicação de enzima a longo prazo a sua atividade diminui com o aumento do número de depressurização (WIMMER e ZAREVÚCKA, 2010).

Lee et al., (1993) , conduziram a reação de hidrólise enzimática com CO₂ supercrítico para produzir glicose a partir do amido, os autores observaram que a velocidade da reação foi aumentada com temperatura e pressão mais elevada.

No trabalho de Benazzi et al., (2013) avaliou-se o uso do dióxido de carbono supercrítico na hidrólise do bagaço para obtenção de açúcares fermentáveis, foram avaliados o efeito da temperatura, pressão e taxa de depressurização, umidade do meio e tempo de reação, foram obtidos resultados interessantes quanto a viabilidade de usar o CO₂ Supercrítico no processo de hidrólise. Obteve-se cerca de 287 g de açúcares fermentáveis por Kg de bagaço de cana seco sendo que este valor representa cerca de 60% de rendimento considerando celulose total, concluindo com esse resultado que o uso dessa tecnologia é interessante pois no processo não existe utilização de solventes tóxicos, a remoção do solvente é completa além do método ter um baixo consumo de água, uma vez que o processo é uma reação sólido-gás.

O uso do CO₂ Supercrítico também foi visto no pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar, o tratamento é capaz de romper a rede lignocelulósica e liberar a celulose e a hemicelulose como substrato para a hidrólise enzimática. No pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar conduzida com CO₂ supercrítico a uma temperatura de 60°C e pressão de 200 bar utilizando etanol e água como modificador de polaridade seguido de um pós tratamento com solução diluída de NaOH em aquecimento a 100°C, este processo mostrou-se mais eficiente, propiciando melhores resultados da deslignificação e recuperação de celulose e conseqüentemente da hidrólise enzimática, independentemente do complexo enzimático utilizado (OLIVEIRA et al., 2013).

O autores Santos et al., (2011) avaliaram também o uso do CO₂ supercrítico no pré-tratamento no bagaço de cana de açúcar eles realizaram uma explosão com CO₂ supercrítico antes da hidrólise, os experimentos foram realizados a diferentes pressões de 120 , 140 e 160 bar a uma temperatura de 60 °C, foi feita a injeção de CO₂ e deixou em repouso durante 5 a

60 min. Após isso, realizou a reação de hidrólise usando a enzima de celulase realizada a 55 ° C durante 8 h. Após o pré-tratamento observou que o rendimento de glicose foi aumentado em cerca de 72 % para a amostra de bagaço, o autor concluiu então que o pré-tratamento com CO₂ aumentou a produção de glicose na faixa de 20%.

Em 2002 foi realizado um estudo sobre a aplicação do CO₂ supercrítico sobre fibras de algodão usando como enzima a celulase, o autor chegou a algumas conclusões em relação ao seu trabalho, a primeira delas é que as condições ideais para a realização do seu trabalho foram de 121,59 bar de pressão e 50° C e tempo de reação de 48 horas, a maior atividade foi obtida com o a enzima celulase conseguindo uma conversão na faixa de 92,3%, e que o total de glicose obtido no experimento foi cerca de 1,2 vezes maior utilizando o método supercrítico do que a obtida com pressão atmosférica, a partir destes resultados podemos concluir que o uso do dióxido de carbono é uma ferramenta interessante para usar na bioconversão para fibras de algodão. (MURATOV e KIM, 2002).

O uso do ultrassom foi avaliado também sobre a atividade da α -amilase e amiloglicosidase, foi realizado o estudo para cada uma das enzimas com o intuito de avaliar os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática na presença e ausência de ultrassom. A energia de ativação também foi estudada para ambas as enzimas na presença e ausência de irradiação, os resultados obtidos para α -amilase e amiloglicosidase apontaram que o ultrassom altera o comportamento de enzimas, uma vez que respondem de modo diferente a alterações de pH e temperatura na presença de ultrassom quando comparada com os efeitos causados na ausência do ultrassom. Os autores constataram que, em temperaturas superiores a 50°C, as atividades das enzimas foram sempre superiores na presença do ultrassom do que na ausência. Já em relação à energia de ativação na presença do ultrassom para as duas enzimas foram reduzidas. Dessa forma, pode-se concluir que o uso do ultrassom é alternativa promissora para melhorar a atividade da enzima, apresentando potencial para aplicação industrial em reações enzimáticas (LEAES et al., 2013).

2.4 Considerações acerca do estado da arte

Nesta revisão bibliográfica o estado da arte teve como intuito descrever sobre a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise ácida e enzimática de materiais lignocelulósicos no caso a casca de arroz utilizando tecnologias avançadas, CO₂ supercrítico e ultrassom.

O arroz é um dos alimentos mais produzidos no mundo, em contrapartida isso gera um grande acúmulo de resíduos agroindustriais, fazendo-se necessário que busquemos algo que diminua essa problemática de acúmulo e desperdício de potencial energético, já que o mesmo pode ser passível de biotransformação. O Brasil é um dos países que mais produz este grão ficando somente atrás da Ásia. Sendo que estado do Rio Grande Sul é o maior produtor brasileiro.

Um dos focos do momento no Rio Grande do Sul é a realização de pesquisas em relação ao uso do arroz para a produção de etanol, a partir deste cenário que estamos vivenciando é interessante então realizar estudos com tecnologias alternativas para que consigamos rendimentos mais atrativos de açúcares para a produção de etanol de segunda geração. Nesse momento então foi oportuno realizar esta pesquisa, foi desenvolvido nesses dois anos o estudo da hidrólise ácida e enzimática da casca de arroz usando a tecnologia de ultrassom e CO₂ supercrítico.

Porém, a hidrólise onde se utiliza enzimas apresenta alguns contratempos o que torna as etapas de pré-tratamento da biomassa quase que indispensável para hidrólise, pois a mesma tem a função de deixar a biomassa lignocelulósica mais acessível ao ataque das enzimas para que as mesmas consigam realizar a hidrólise da celulose em açúcares fermentescíveis. Entretanto no trabalho desenvolvido foi apresentada uma forma de realizar o processo de maneira diferente das usuais, pulando a etapa de pré-tratamento e realizando a hidrólise em uma etapa apenas.

Os resultados obtidos foram de certa forma satisfatórios, pois foi possível obter rendimentos de açúcares redutores da casca de arroz realizado em uma etapa somente, sem a necessidade da etapa que antecede que é o pré-tratamento do material lignocelulósico, esse foi um dos diferenciais do trabalho realizado. A partir desta metodologia é possível fazer considerações quanto à economia nos processos para obtenção de açúcares, já que o processo aconteceu em um tempo mais curto e teve economia com reagentes.

Outro ponto interessante abordado no trabalho foi o uso do Ácido Fosfórico, já que mesmo não é o ácido mais comumente usado. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura usam o ácido sulfúrico, portanto o uso do ácido fosfórico foi outro diferencial e uma abertura para que novas pesquisas sejam realizadas utilizando este ácido já que os resultados obtidos foram interessantes utilizando-o.

Na maioria das revisões da literatura acerca deste assunto, os mesmos apresentam as duas etapas distintas, o que encarece o processo, dificultando uso do mesmo em grande escala, já que hoje o que buscamos é uma produção de etanol de segunda geração mais barata, tornando-o viável economicamente.

Devido à grande busca por tecnologias mais limpas e viáveis economicamente, surgiu então esta proposta de trabalho, que é a junção do processo de pré-tratamento da hidrólise da biomassa lignocelulósica em uma única etapa de processo, que seria diretamente a hidrólise utilizando fluidos supercríticos neste caso o CO₂ supercrítico e o ultrassom.

3. ARTIGO 1: Hydrolysis of rice hulls using phosphoric acid to obtain fermentable sugars using conventional and ultrasound-assisted technologies

Submetido para publicação na revista Chemical Engineering and Processing – Process Intensification

Jéssica M. Moscon^a, Wagner L. Priamo^b, Juliana R. F. Silva^a, Edson L. Foletto^a, Sérgio L. Jahn^a, Raquel C. Kuhn^a, Adriano Cancelier^a, Marcio A. Mazutti^{a,*}

^aDepartment of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil

^bDepartment of Food Technology, IFRS - Campus Sertão, Sertão, RS, 88040-900, Brazil

3.1 ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars by conventional and ultrasound-assisted acid hydrolysis. For this purpose, the methodology of experimental design was used to optimize the temperature, moisture content and concentration of phosphoric acid on the yield of fermentable sugar. The yields obtained at optimized conditions were 113.0 and 162.0 g.kg⁻¹ for conventional and ultrasound-assisted hydrolysis, where the yield obtained by ultrasound-assisted hydrolysis was around 43% higher than for the conventional hydrolysis. In addition, it was possible to obtain high yield using less acid and low temperature, in a manner that ultrasound can be used as a device for process intensification.

Key-words: Acid hydrolysis, reducing sugar, ultrasound, rice husk

*Corresponding author: mazutti@ufsm.br (M.A. Mazutti); Tel.: +55-55-3220-9592

3.2 Introduction

The rapid depletion of fossil fuels has driven the world to utilize renewable-energy sources such as biofuel in order to reduce the total dependency on non-renewable energy sources. The growing industrialization has derived in an increasing demand of fuels attempting to satisfy both the industrial and domestic demands. Lignocellulosic agricultural residues are promising raw materials for sugar platform biorefinery on a large scale. As they are residues and wastes, they do not compete with primary food production. However, few biorefinery processes based on sugar-platform are cost-competitive in current markets because of the low efficiency and high cost of conversion processes [1].

Rice is an important agricultural culture and implies 20% of the world's nutritional energy. Rice hulls represent approximately 20% dry weight of the harvest, being an abundant lignocellulosic residue, mainly in the state of Rio Grande do Sul – Brazil, what is the major Brazilian producer of rice accounting for about 50% of all amount produced in the country. It is a residue abundant and low value added by its very low value as animal feed because it is a product of difficult digestibility, low density and large amount of ash / silica as abrasive components and features [2].

According to Yu et al [3], the processing of rice generates large amounts of waste, such as straw and rice hulls, and more than 113 million rice husk are generated each year in the world. The average composition of rice residues from harvest and processing (straw and hulls) is: cellulose (32–47%), hemicelluloses (19–27%) and lignin (5–24%) [4], whereas rice hulls consist on 36–40% cellulose, and 12–19% hemicelluloses [5-8]. They also have fats, gums, alkaloids, resins, essential oils and other cytoplasmic components (extractives), and about 12% of ashes, composed mainly by silica (80–90%), but also by K_2O , P_2O_5 (5%), CaO (4–1.2%), and small amounts of Mg, Fe, and Na [9-10]. The complex chemical composition of rice hulls represents an additional barrier for the release of cellulose.

In order to overcome the difficulties in hydrolysis of rice hulls, an alternative cost-effective way consists in the use of ultrasound technology, which has received enough attention to the improvement of various biotechnological processes in the last decade [11]. This technology has been used to assist in extraction of lignin and hemicellulose from the lignocellulosic biomass with an aqueous alkaline or neutral, such as corn hulls, wheat hulls, buckwheat hull, wheat straw, rice husk, ultrasonic irradiation on the solid-liquid interface showed some surface erosion or particle size reduction. The effect of ultrasonic irradiation is to produce cavitation in liquids to aid the progress of chemical reactions for creating bubbles and hot-spot generation. This phenomenon can be applied in the pretreatment of biomass to achieve effective processing [12].

Based on this, this article aims to evaluate the influence of ultrasound on the acidic hydrolysis of rice hulls to obtain sugars with commercial interests.

3.3 Material and Methods

Materials

The rice husks used in this study were obtained from a local processing factory (Primo Berleze, Santa Maria, Brazil). The samples, as soon as they were received, were milled, sieved and maintained at temperature of -4°C until the experiments. It was used 10 g of rice husks as a sample for each experiment. The reagents phosphoric acid (85 wt%, Vetec) and 3,5 dinitrosalicilic acid (Vetec) were used as received.

Equipment

Experiments were carried out in an ultrasonic bath with temperature control (Unique Inc. model USC 1800A, Brazil, BR) equipped with a transducer having longitudinal vibrations. The ultrasonic unit has an operating frequency of 40 kHz and a maximum-rated

electrical power output of 132 W. The ultrasonic transducer (surface area of 282.2 cm²) is fitted at the bottom of the bath horizontally along the length of bath.

Experimental method

The reactions were carried out using a beaker containing 10 g of rice hulls (dry basis). Before the reactions, temperature, moisture and acid concentration were adjusted to the appropriated values based on the literature and preliminary experiments. All reactions were carried out by 240 minutes and, at the end, the whole content of the beaker was sampled for sugar extraction. The amount of fermentable sugar released was assessed by taken an aliquot free of solids. The same experiment was carried out in the presence and absence of ultrasound irradiation for sake of comparison. In this work, it was evaluated the effects of temperature, moisture and concentration of phosphoric acid on the amount of fermentable sugar released by mean a central composite rotational design (CCRD) for three independent variables. Table 1 presents the range of investigated variables. All the results were analyzed using the software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90%.

Determination of fermentable sugar

After the hydrolysis, the fermentable sugars were extracted from the solid material using distilled water at solid to liquid ratio of 0.1 (dry basis). The extractions were carried out at 30 °C under orbital shaker agitation of 150 rpm during 30 minutes. Afterwards, the solution was filtered by vacuum filtration (Whatman qualitative filter paper, grade 1) and the supernatant was used to determine the amount of fermentable sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) [13].

3.3.1 Results and Discussion

Table 1 presents the fermentable sugar yields and hydrolysis efficiencies obtained in the seventeen runs of the CCRD for the conventional and ultrasound-assisted acid hydrolysis. The fermentable sugar yield for conventional hydrolysis ranged from 6.4 g.kg⁻¹ (run 10) to 143.5 g.kg⁻¹ (run 7), whereas the fermentable sugar yield for ultrasound-assisted hydrolysis ranged from 22.5 g.kg⁻¹ (run 1) to 165.8 g.kg⁻¹ (run 15). The mean yields of fermentable sugar (considering the 17 runs) were 60.9 and 79.5 g.kg⁻¹, in the conventional and ultrasound-assisted hydrolysis, respectively. This result showed that the uses of ultrasound for acid hydrolysis of rice hulls can be considered a tool to promote process intensification. In a general way, the yield of fermentable sugar in the ultrasound-assisted hydrolysis was always greater than for the conventional one.

According to Bussemaker and Zhang [14], ultrasonic pretreatment results in the loose structure and eroded surface of rice husk via cavitation occurred near the surface of rice husk. This could be result in the increase of the surface area of rice husk. The increased surface area is conducive to improve the accessibility of the rice husk, heat and mass transfer. The ultrasound causes partial decomposition of the lignin network structure. These results indicate that ultrasonic pretreatment breaks the bind of lignin to some extent, and releases more cellulose and hemicellulose on the surface of rice husk [15]. Considering only the runs 15-17 (central points of the CCRD), the increasing in the yield for the ultrasound-assisted hydrolysis was 55% higher than conventional one, what is statistically significant by Tukey test ($p < 0.05$).

The experimental results presented in the Table 1 were used to determine the effects of the studied variables on yield of fermentable sugar. The effects were expressed in the form of Pareto chart, which are presented in the Fig. 1. For the conventional hydrolysis (Fig. 1a), only quadratic term for moisture content as well as the interaction term for temperature and acid

concentration were statistically significant ($p < 0.1$), whereas other terms as linear and interaction were not significant in the studied range ($p < 0.1$). The negative sign of the quadratic terms indicate the presence of a maximum point for moisture content in the evaluated range, whereas the increase of temperature and acid concentration can result in the increase in the yield, since the interaction effect of this term was positive. For the ultrasound assisted hydrolysis (Fig. 1b), it was observed that only the quadratic terms of the independent variables were statistically significant ($p < 0.1$) in the evaluated range. The negative signs of the quadratic terms indicate the presence of a maximum point for all variables in the evaluated range.

In order to optimize the experimental condition to obtain maximum yield of fermentable sugar, two empirical models are presented below. Eq. 1 presents the significant terms ($p < 0.1$) concerning to conventional hydrolysis, and Eq. 2 referring to ultrasound-assisted hydrolysis.

$$FS = 112.78 - 39.55 \cdot M^2 + 28.13 \cdot T \cdot H \quad (1)$$

$$FS_{US} = 161.97 - 25.65 \cdot M^2 - 41.71 \cdot T^2 - 38.26 \cdot H^2 \quad (2)$$

where FS and FS_{US} are the yielding of fermentable sugar ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) obtained by conventional and ultrasound-assisted acid hydrolysis, respectively, T, M and H are the coded temperature, moisture content and acid concentration respectively. These models were validated by analysis of variance (ANOVA). The calculated F-test for Eq. 1 and 2 were about 3.2 and 6.5 times greater than the tabulated ones for significance at $p = 0.1$, and the determination coefficients (R^2) were 0.7915 and 0.8707, respectively. The high values for the determination coefficient indicate good fitting of experimental data, allowing the use of such models to predict process performance as well as to use them as tool for process optimization. The applicability of these models are explored in Fig. 2 to 4.

Fig. 2 presents the influence of the moisture content and temperature on the yield of fermentable sugar for conventional (Fig. 2a) and ultrasound-assisted hydrolysis (Fig. 2b). For conventional hydrolysis, the maximum yield of fermentable sugar predicted is around 100 g.kg^{-1} for moisture content around 60wt% and temperature ranging from 45 to 62°C . For ultrasound-assisted hydrolysis, the maximum yield of fermentable sugar predicted is around 175 g.kg^{-1} , almost two times greater than conventional one. The highest yield can be obtained for a temperature ranging from 44 to 48°C and moisture content from 54 to 64wt%.

Fig. 3 presents the influence of the acid concentration and moisture content on the yield of fermentable sugar for conventional (Fig. 3a) and ultrasound-assisted hydrolysis (Fig. 3b). In a similar way that for Fig. 2, the highest yield was obtained for moisture content around 60wt% for both systems. However, the optimized region for acid concentration ranged from 18 to 28 wt% for conventional hydrolysis and from 16 to 20 wt% for ultrasound-assisted hydrolysis.

Fig. 4 presents the influence of the acid concentration and temperature on the yield of fermentable sugar for conventional (Fig. 4a) and ultrasound-assisted hydrolysis (Fig. 4b). For conventional hydrolysis, the highest yield predicted was around 150 g.kg^{-1} for acid concentration ranging from 24 to 30wt% and temperature from 58 to 65°C . By other hand, the optimized yield for ultrasound-assisted hydrolysis presented a centered region for both independent variables. The results presented in Fig. 4 demonstrated that the ultrasound can be used as an alternative to process intensification, since it is possible to use less acid and lower temperature obtaining higher yields of fermentable sugar compared to the conventional hydrolysis. The ultrasonic treatment changes the structure of cellulose and enhances the accessibility of the acid to it. Ultrasonic treatment can also assist the mass transfer of the dissolved components from lignocellulosic biomass and enhance the release of polysaccharides [16].

3.3.2 Conclusions

This paper was presented experimental data referring the hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars by conventional and ultrasound-assisted acid hydrolysis. The optimized condition obtained from analysis of contour plots for conventional hydrolysis was moisture content 60wt%, acid concentration 18.8 wt% and 65°C, being obtained a yield about 113.0 g.kg⁻¹. For ultrasound-assisted hydrolysis, the optimized condition was moisture content 60wt%, acid concentration 15 wt% and 45°C, resulting in a yield of 162.0 g.kg⁻¹. The yield of fermentable sugar obtained by ultrasound-assisted hydrolysis at optimized condition was around 43% higher than for the conventional hydrolysis. Besides the increase in the yield obtained, the optimized acid concentration and temperature were lower than for conventional one. In practice, it is possible to obtain high yield using less acid and low temperature, in a manner that ultrasound can be used as a device for process intensification.

3.3.3 Acknowledgements

The authors thank CNPq and CAPES for the financial support of this work and scholarships.

3.3.4 References

- [1] A. Diaz, J. Le Toullec, A. Blandino, I. de Ory, I. Caro, **Pretreatment of Rice Hulls with Alkaline Peroxide to Enhance Enzyme Hydrolysis for Ethanol Production**, Chemical Engineering Transactions 32 (2013) 949-954.
- [2] L. R. Hickert, **Optimization of hydrolysis of rice husk (*Oryza sativa*) and assessing the ability of ethanol and xylitol bioconversion by yeasts**, M.Sc. Thesis, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 2010.

- [3] J. Yu, J. Zhang, J. He, Z. Liu, Z. Yu, **Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull**, *Bioresource Technology* 100 (2009) 903- 908.
- [4] P. Binod, R. Sindhu, R. Singhanian, S. Vikram, L. Devi, S. Nagalakshmi, N. Kurien, R. Sukumaran, A. Pandey, **Bioethanol production from rice straw: an overview**, *Bioresource Technology* 101 (2010) 4767–4774.
- [5] S. Banerjee, R. Sen, R.A. Pandey, T. Chakrabarti, D. Satpute, B. S. Giri, S. Mudliar, **Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization**, *Biomass and bioenergy* 33 (2009) 1680–1686.
- [6] B.C. Saha, L.B. Iten, M.A. Cotta, Y.V. Wu, **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol**, *Biotechnology Progress* 21 (2005) 816–822.
- [7] B. Saha, M. Cotta, **Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol**, *Enzyme and Microbial Technology* 4 (2007) 1528–1532.
- [8] B. C. Saha, M. A. Cotta, **Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol**, *Biomass and Bioenergy* 32 (2008) 971– 977.
- [9] M. K. Diel Rambo, **Utilization of rice husk for the production of xylitol and silica xerogel**, M. Sc. Thesis, Federal University of Santa Maria, 2009.
- [10] D. B. Bevilaqua, **Production of levulinic acid by acid hydrolysis of rice husk**, M. Sc. Thesis, Federal University of Santa Maria, 2010.

- [11] E.V. Rokhina, P. Lens, J. Virkutyte, **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art**, Trends in biotechnology 27 (2009) 298-306.
- [12] C. Yang, I. Sheih, T. J. Fang, **Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment**, Ultrasonics Sonochemistry 19 (2012) 687–691.
- [13] G.L. Miller, **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**, Analytical Chemistry 31 (1959) 426–428.
- [14] **M. J. Bussemaker, D. Zhang**, Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications, **Industrial and Engineering Chemistry Research** 52 (2013) 3563-3580.
- [15] W. Shi, J. Jia, Y. Gao, Y. Zhao, **Influence of ultrasonic pretreatment on the yield of bio-oil prepared by thermo-chemical conversion of rice husk in hot-compressed water**, Bioresource Technology 146 (2013) 355–362.
- [16] F. Guo, Z. Fanga, C. C. Xu, R. L. Smith Jr., **Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels**, Progress in Energy and Combustion Science 38 (2012) 672-690.

List of Figure Captions

Fig. 1. Pareto Chart showing the effects of linear, quadratic and interaction terms of independent variables on the yielding of fermentable sugars obtained by conventional (a) and ultrasound-assisted acid hydrolysis (b).

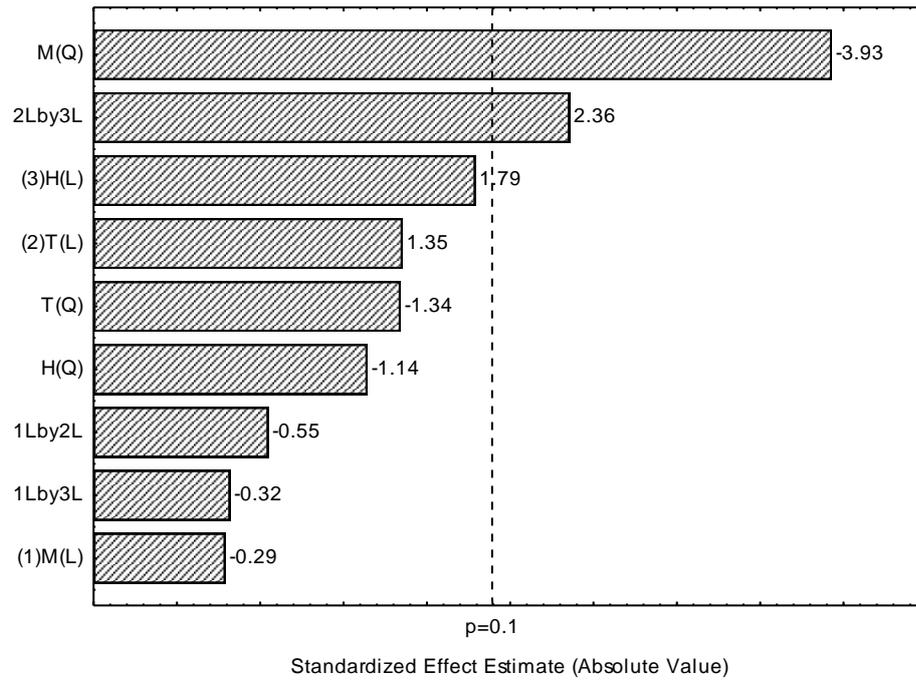
Fig. 2. Contour plots showing the influence of temperature and moisture content on the yielding of fermentable sugars obtained by conventional (a) and ultrasound-assisted acid hydrolysis (b). Acid concentration was maintained at the central point of the CCRD (18.8 wt%).

Fig. 3. Contour plots showing the influence of acid concentration and moisture content on the yielding of fermentable sugars obtained by conventional (a) and ultrasound-assisted acid hydrolysis (b). Temperature was maintained at the central point of the CCRD (47.5°C).

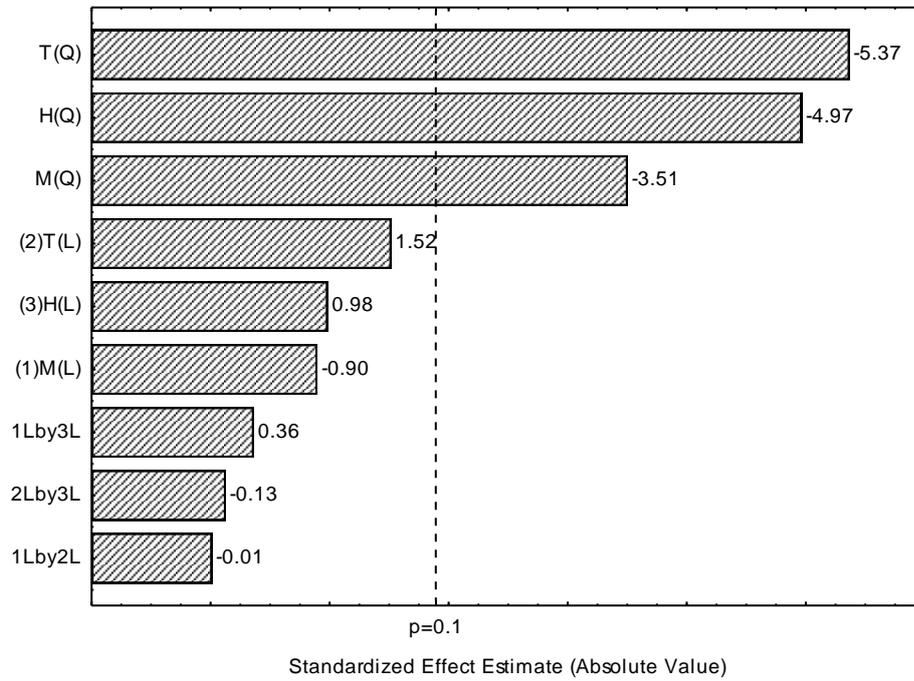
Fig. 4. Contour plots showing the influence of acid concentration and temperature content on the yielding of fermentable sugars obtained by conventional (a) and ultrasound-assisted acid hydrolysis (b). Moisture content was maintained at the central point of the CCRD (60 wt%).

Table 1. Matrix of the experimental results obtained in the CCRD.

| Run | Moisture Content (wt%) | Temperature (°C) | Acid concentration (wt%) | Conventional Yield (g.kg⁻¹) | Ultrasound Yield (g.kg⁻¹) |
|------------|---------------------------------------|-----------------------------|---|---|---|
| 1 | 48 (-1) | 37.0 (-1) | 12.1 (-1) | 12.9 | 22.5 |
| 2 | 72 (1) | 37.0 (-1) | 12.1 (-1) | 18.3 | 30.4 |
| 3 | 48 (-1) | 58.0 (1) | 12.1 (-1) | 12.4 | 65.5 |
| 4 | 72 (1) | 58.0 (1) | 12.1 (-1) | 9.1 | 52.5 |
| 5 | 48 (-1) | 37.0 (-1) | 25.4 (1) | 14.0 | 33.6 |
| 6 | 72 (1) | 37.0 (-1) | 25.4 (1) | 21.6 | 36.0 |
| 7 | 48 (-1) | 58.0 (1) | 25.4 (1) | 143.5 | 51.0 |
| 8 | 72 (1) | 58.0 (1) | 25.4 (1) | 107.4 | 73.2 |
| 9 | 40 (-1.68) | 47.5 (0) | 18.8 (0) | 12.3 | 139.1 |
| 10 | 80 (1.68) | 47.5 (0) | 18.8 (0) | 6.4 | 70.5 |
| 11 | 60 (0) | 30.0 (-1.68) | 18.8 (0) | 93.8 | 46.9 |
| 12 | 60 (0) | 65.0 (1.68) | 18.8 (0) | 71.9 | 72.1 |
| 13 | 60 (0) | 47.5 (0) | 7.5 (-1.68) | 91.6 | 44.8 |
| 14 | 60 (0) | 47.5 (0) | 30.0 (1.68) | 85.4 | 93.7 |
| 15 | 60 (0) | 47.5 (0) | 18.8 (0) | 105.8 | 165.8 |
| 16 | 60 (0) | 47.5 (0) | 18.8 (0) | 99.8 | 155.1 |
| 17 | 60 (0) | 47.5 (0) | 18.8 (0) | 129.8 | 159.6 |

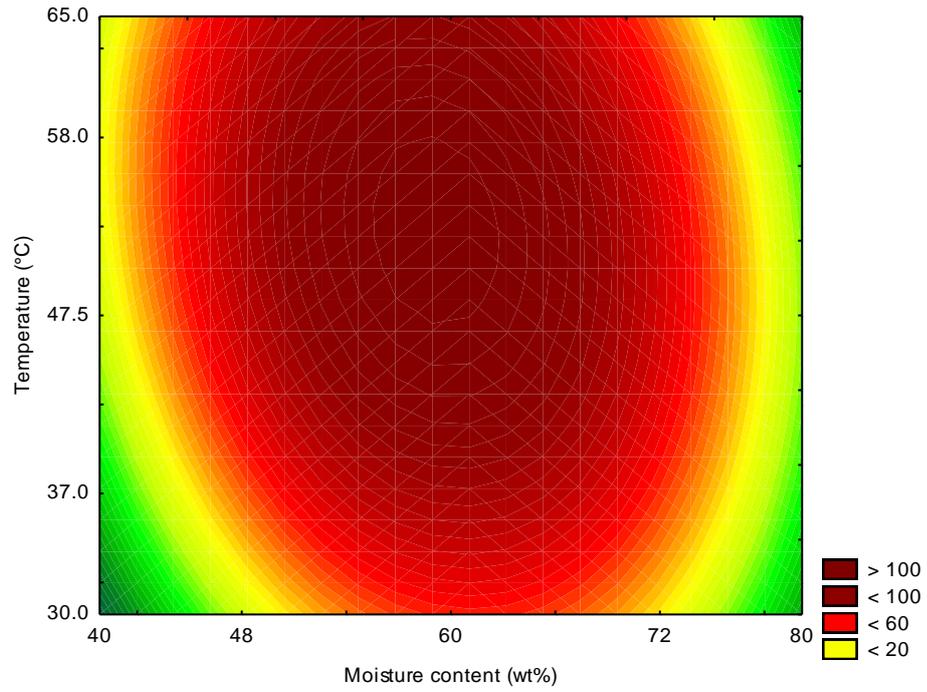


a)

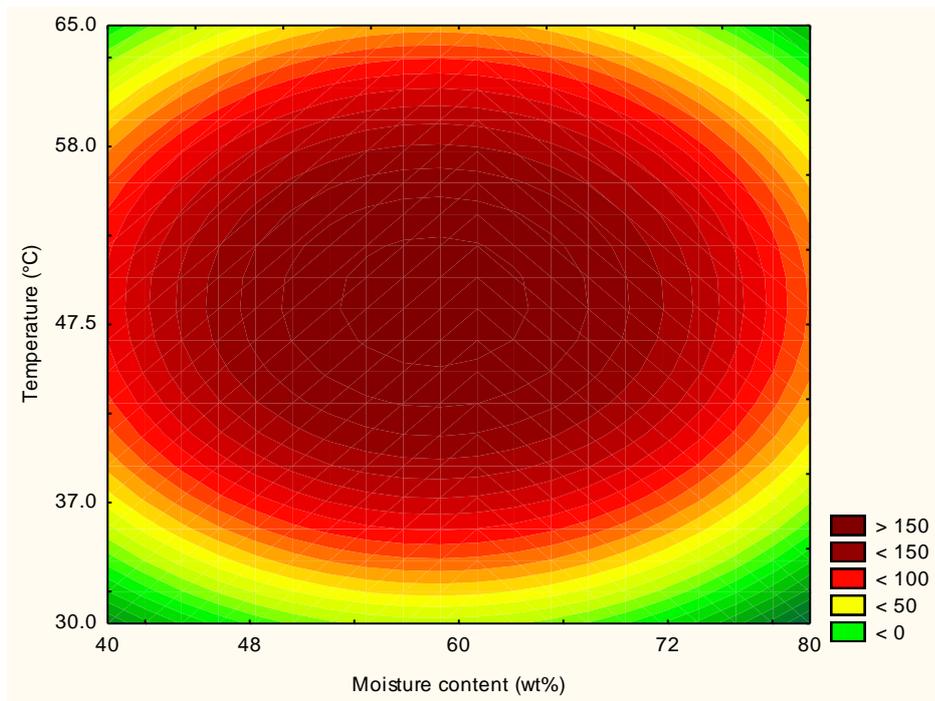


b)

Figure 1.

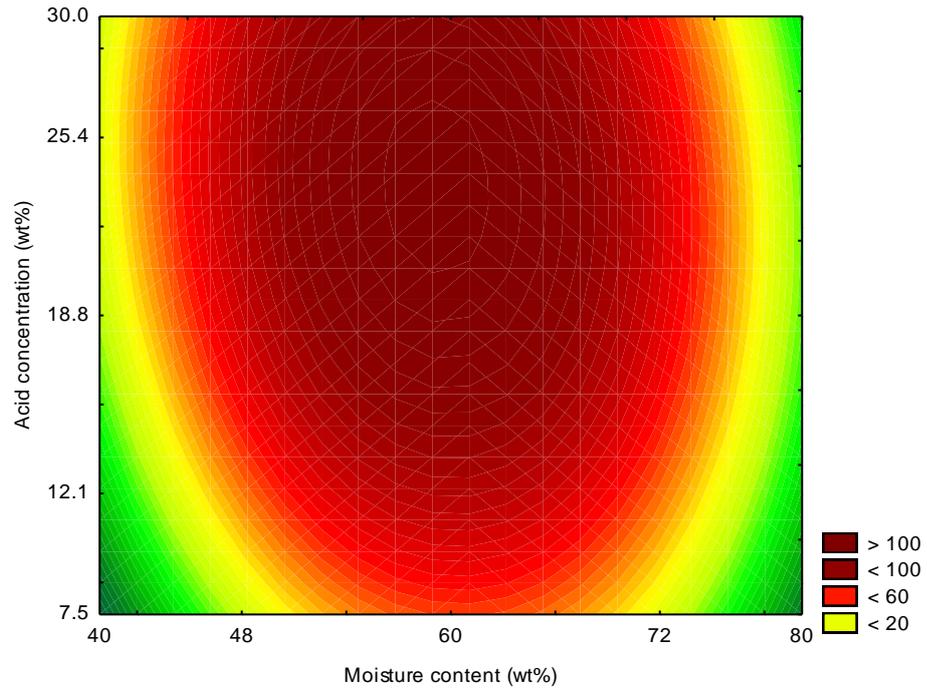


a)

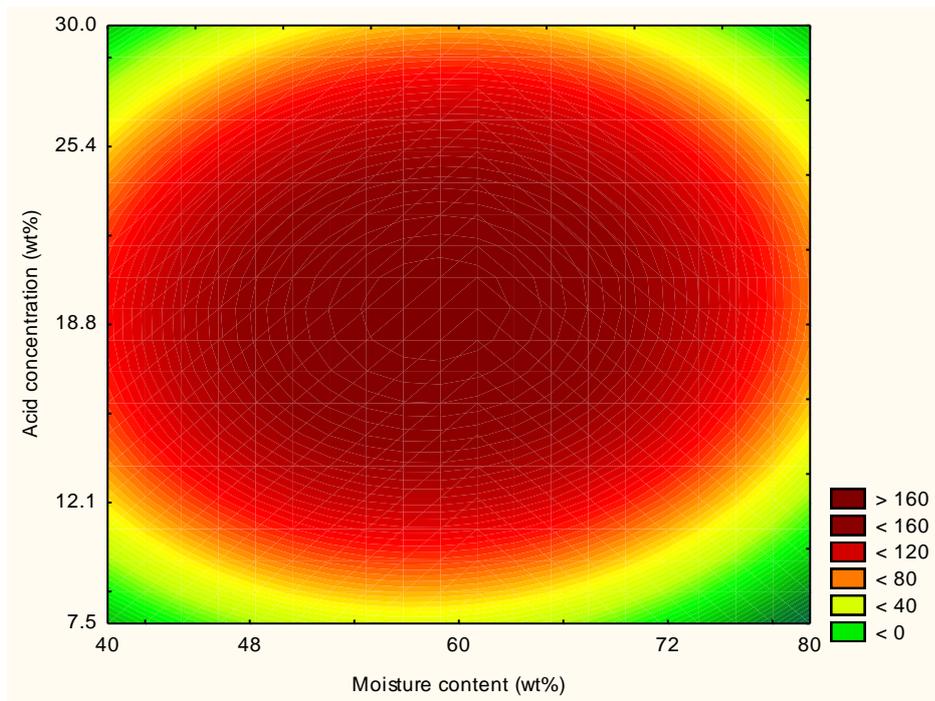


b)

Figure 2.

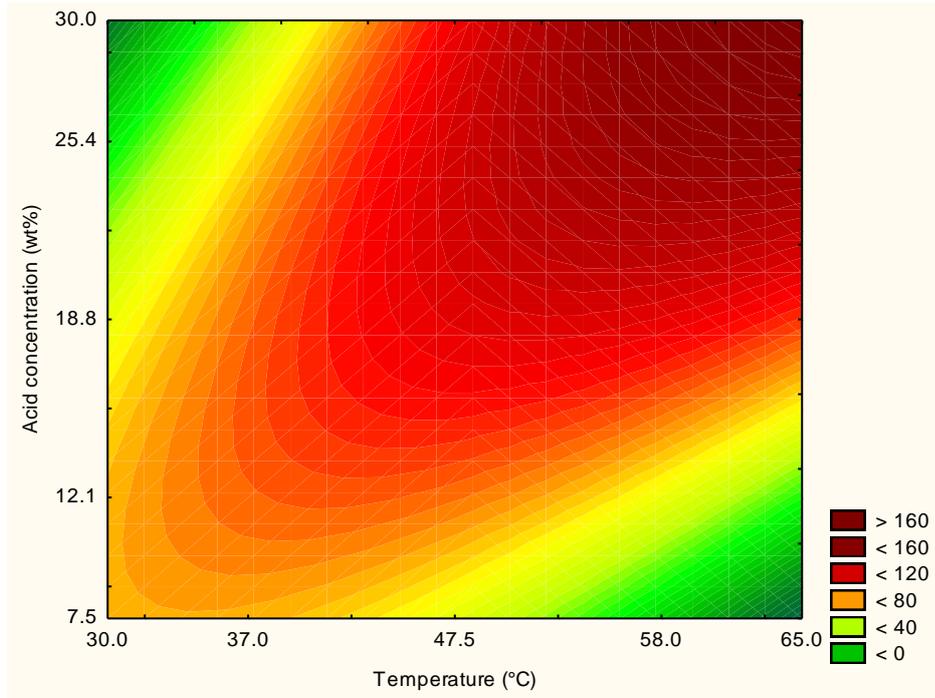


a)

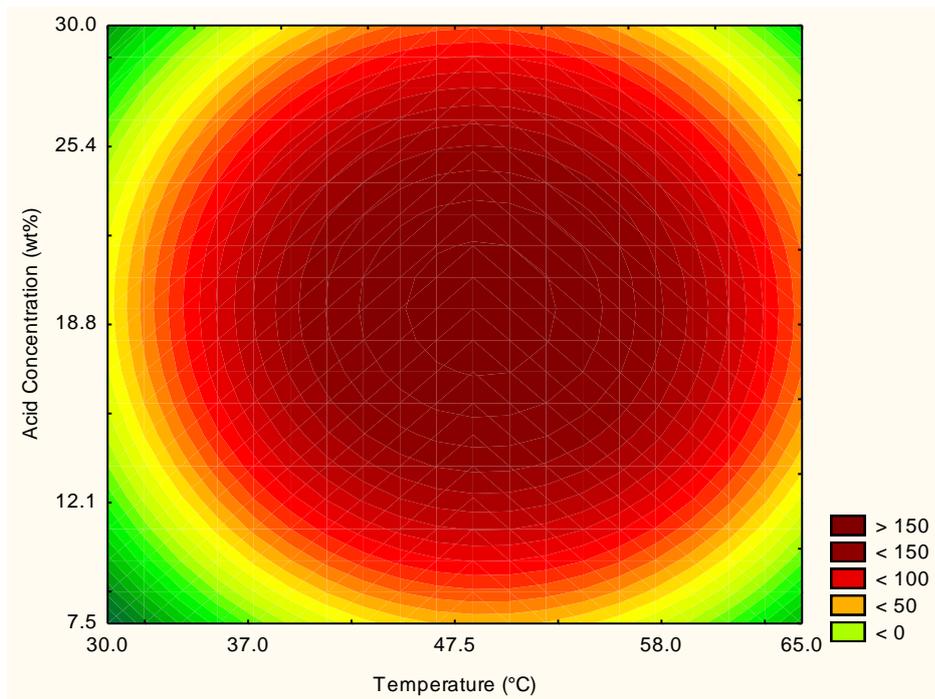


b)

Figure 3.



a)



b)

Figure 4.

4. ARTIGO 2: Enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars using innovative technologies

Submetido para publicação na revista International Journal of Chemical Engineering

Jéssica M. Moscon^a, Wagner L. Priamo^b, Juliana R. F. Silva^a, Edson L. Foletto^a, Sérgio L. Jahn^a, Raquel C. Kuhn^a, Adriano Cancelier^a, Marcio A. Mazutti^{a,*}

^aDepartment of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil

^bDepartment of Food Technology, IFRS - Campus Sertão, Sertão, RS, 88040-900, Brazil

4.1 ABSTRACT

In this work was investigated the use of innovative technologies to improve the enzymatic hydrolysis of rice hulls. It was evaluated the use of supercritical CO₂ as co-solvent and ultrasound-assisted hydrolysis and the results were compared with conventional procedure. Maximum yield of fermentable sugar obtained was about 16 g.kg⁻¹ using conventional or ultrasound-assisted hydrolyses. The yield obtained in the hydrolysis using supercritical CO₂ was around 4.2 g.kg⁻¹ as co-solvent. Enzymatic hydrolysis using conventional procedure showed to be the best alternative to obtain fermentable sugar from rice hulls since the innovative technologies employed did not lead to better results.

*Corresponding author: mazutti@ufsm.br (M.A. Mazutti); Tel.: +55-55-3220-9592

Keywords: Enzymatic hydrolysis; fermentable sugar; ultrasound-assisted; supercritical CO₂; rice hulls.

4.2 Introduction

Rice is an important crop in many countries and is abundantly produced worldwide. Annually 465.078 MT of rice are produced globally, and for every kilogram of harvested paddy 20–33% of rice husk was generated. Rice husk contains about 28.6 % of cellulose, 28.6 % of hemicellulose, 24.4 % of lignin and 18.4 % of extractive matter [1]. Rice husk is an abundant lignocellulosic residue, mainly in the state of Rio Grande do Sul – Brazil, what is the major Brazilian producer of rice accounting for about 50% of all amount produced in the country. It is a residue so abundant and low value added by its very low value as animal feed because it is a product of difficult digestibility, low density and large amount of ash / silica as abrasive components and features [2].

An alternative to the use of this waste is the production of second generation bioethanol by hydrolysis of cellulose, obtaining fermentable sugars. Cellulases are important enzymes considering the production of second generation bioethanol from lignocellulosic materials. The enzyme complex acts on cellulosic material promoting its hydrolysis. These enzymes are highly specific biocatalysts acting in synergism to release sugars, of which glucose presents the greatest industrial interest, due to the possibility of using it as substrate for ethanol production by fermentation [3].

Among the possibilities to carry out enzymatic reactions there is the use of a solid-state enzyme reaction, which is defined as the reaction involving solids (rice husk) in absence (or near absence) of free water; however, substrate must possess enough moisture to support the action of the enzymes. The main advantage of this procedure is the fact that the process is conducted in the absence of a free aqueous phase, resulting in minimum water consumption

and thus a low production of effluent. As the amount the water can be adjusted to a minimum during the extraction of hydrolyzed sugars, the resulting solution is more concentrated than traditional enzyme hydrolysis. The concept and advantages of solid-state enzymatic reaction were adapted from solid-state fermentation [4].

Recently there have arisen new alternatives for the hydrolysis of cellulose, as the use of pressurized fluid and ultrasound [5-10]. The use of supercritical carbon dioxide has received attention for biomass pre-treatment due to the mild temperatures that can be employed, hence resulting in lesser production of undesirable, degradation, compounds, and because the pre-treated material presents no solvent residues, since CO₂ is gaseous at environmental conditions [11]. The ultrasound has been used to assist in extraction of lignin and hemicellulose from the lignocellulosic biomass with an aqueous alkaline or neutral, such as corn hulls, wheat hulls, buckwheat hull, wheat straw, rice husk, ultrasonic irradiation on the solid-liquid interface showed some surface erosion or particle size reduction. The effect of ultrasonic irradiation is to produce cavitation in liquids to aid the progress of chemical reactions for creating bubbles and hot-spot generation. This phenomenon can be applied in the pretreatment of biomass to achieve effective processing [12]. Although ultrasound or supercritical CO₂ are intensively used to carry out pretreatment of biomass, little attention has been paid in the design of intensified enzyme-based processes for hydrolysis of lignocellulosic residues without pretreatment using these innovative technologies.

Based on this, this article aims to evaluate the influence of ultrasound and supercritical CO₂ on the enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain sugars with commercial interests. For this purpose, two central composite rotational design were conceived to evaluate the influence of moisture content, enzyme load and temperature on conventional and ultrasound-assisted hydrolysis, whereas a central composite design was conceived to evaluate the effects of

pressure, enzyme load and moisture content on hydrolysis using supercritical CO₂ as co-solvent.

4.3 Material and methods

Materials

The rice husks used in this study were obtained from a local processing factory (Primo Berleze, Santa Maria, Brazil). The samples, as soon as they were received, were milled, sieved and maintained at temperature of -4°C until the experiments. It was used 10 g of rice husks as a sample for each experiment. The enzyme used in this study was the cellulolytic complex from *Trichoderma reesei* (NS50013) kindly donated by Novozymes Latin American (Brazil). Carbon dioxide with a purity of 99.5% (liquid phase) was purchased from Air Liquid S.A. (Brazil).

Enzymatic hydrolysis by conventional and ultrasound-assisted technologies

Experiments were carried out in an ultrasonic bath with temperature control (Unique Inc. model USC 1800A, Brazil, BR) equipped with a transducer having longitudinal vibrations. The ultrasonic unit has an operating frequency of 40 kHz and a maximum-rated electrical power output of 132 W. The ultrasonic transducer (surface area of 282.2 cm²) is fitted at the bottom of the bath horizontally along the length of bath.

The reactions were carried out using a beaker containing 10 g of rice hulls (dry basis). Before the reactions, temperature, moisture and load enzyme were adjusted to the appropriated values. All reactions were carried out by 240 minutes and, at the end, the whole content of the beaker was sampled for sugar extraction. The amount of fermentable sugar released was assessed by taken an aliquot free of solids. The same experiment was carried out in the presence and absence of ultrasound irradiation for sake of comparison. In this work, it

was evaluated the effects of temperature, moisture and load enzyme on the amount of fermentable sugar released by mean a central composite rotational design (CCRD) for three independent variables. Table 1 presents the range of investigated variables.

Enzymatic hydrolysis using supercritical CO₂ as co-solvent

The enzymatic hydrolysis of rice hulls was performed in a laboratory scale unit, which consists basically of a CO₂ reservoir, two thermostatic baths, a syringe pump (ISCO 500D), a stainless steel vessel (cell) with an internal volume of 100 mL, an absolute pressure transducer (Smar, LD301) equipped with a portable programmer (Smar, HT201) with a precision of ± 0.4 bar. The experimental setup consisted of 1/8" OD tubing of stainless steel (HIP). Between the pump and the solvent reservoir a check valve (one-way) (HIP 15-41AF1-T 316SS) was positioned to avoid pressurized solvent back flow to the head of the solvent reservoir. Two additional micrometering valves (HIP 15-11AF2 316SS) completed the experimental apparatus, one located after the syringe pump, at the entrance of high-pressure cell, to allow solvent loading and the other just after the cell to perform solvent discharge.

Amounts of approximately 10 g of rice hulls (dry basis) were charged into the high-pressure vessel at pre-selected moisture content. The CO₂ was pumped into the bed, which was kept in contact with the rice hulls at 47°C and defined pressure during 4 hours of reaction. Afterwards, the system was depressurized at constant rate by opening a micrometering valve and the hydrolyzed material used for extraction of fermentable sugar according to procedure defined below. The effects of moisture content, pressure and enzyme load on the hydrolysis of rice hulls were assessed by means of central composite design (CCD) with 8 runs plus 3 central points. Table 2 presents the range of each variable investigated.

Determination of fermentable sugar

After the hydrolysis, the fermentable sugars were extracted from the solid material using distilled water at solid to liquid ratio of 0.1 (dry basis). The extractions were carried out at 30 °C under orbital shaker agitation of 150 rpm during 30 minutes. Afterwards, the solution was filtered by vacuum filtration (Whatman qualitative filter paper, grade 1) and the supernatant was used to determine the amount of fermentable sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) [13]. The value obtained was used to calculate the yield of hydrolysis. All results were expressed as gram of fermentable sugar per kg of dry rice hulls.

Statistical analysis

All the results were analyzed using the software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90%.

4.3.1 Results and Discussion

Enzymatic hydrolysis of rice hulls by conventional and ultrasound-assisted technologies

Table 1 presents the results in terms of yield of hydrolysis in the seventeen runs of the CCRD for the conventional and ultrasound-assisted hydrolysis. To better understand the effects of independent variables on the responses, data of Table 1 were used to determine the effects of each studied variables on yield of fermentable sugar. The effects were expressed in the form of Pareto chart, which are presented in the Fig. 1. For the conventional hydrolysis (Fig. 1a) only quadratic term for temperature and linear term for enzyme load were statistically significant ($p < 0.1$) in the range evaluated. The analysis of effects demonstrates that the increase of enzyme load could increase the yield of hydrolysis. This finding is evident when comparing runs 1-4 (low enzyme load) with runs 5-8 (high enzyme load), where the yield of hydrolysis was high when more enzyme was used in the process.

Fig. 1b presents the effects for ultrasound-assisted hydrolysis, where is seen a different behavior in relation to conventional hydrolysis. Only linear terms for moisture content and temperature were not significant ($p < 0.1$) in the evaluated range. Once more, linear term for enzyme load was the most significant term and is indicating that more enzyme is required to increase the yield. The negative sign of the quadratic terms indicate the presence of a maximum point for moisture content and temperature. The influence of quadratic term for temperature on yield for ultrasound-assisted hydrolysis was more severe than for conventional one. In practice, the reduction of yield is more severe when the temperature is increased from 40 to 70°C for reactions in the ultrasound than water bath, since the ultrasound is an auxiliary source of energy and can be deactivate the enzyme. This was confirmed comparing the magnitude of linear term for enzyme load, where it is about 3 times higher for ultrasound-assisted reactions than conventional one. If the deactivation is more pronounced, more enzyme is required to carry out the same reaction, since there is no significant difference in the yield of hydrolysis in the two systems.

In order to optimize the experimental condition to obtain maximum yield of fermentable sugar, an empirical model is presented below. Eq. 1 presents the significant terms ($p < 0.1$) concerning to ultrasound-assisted hydrolysis. For conventional hydrolysis, the model generated was not statistically validated and, for this reason, it was not presented here.

$$FS_{US} = 12.77 + 1.79 \cdot M^2 - 3.42 \cdot T^2 + 5.07 \cdot E - 1.76 \cdot E^2 - 3.63 \cdot T \cdot M - 3.23 \cdot T \cdot E - 2.03 \cdot M \cdot E \quad (1)$$

where FS_{US} is the yield of fermentable sugar ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) obtained by ultrasound-assisted hydrolysis, respectively, T , M and E are the coded temperature, moisture content and enzyme load. This model was validated by analysis of variance (ANOVA). The calculated F-test was about 6.5 times greater than the tabulated one for significance at $p = 0.1$, and the determination coefficient (R^2) was 0.9272. The high values for the determination coefficient indicate good

fitting of experimental data, allowing the use of such models to predict process performance as well as to use it as tool for process optimization. The applicability of these models is explored in Fig. 2.

Fig. 2a presents the influence of the moisture content and temperature on the yield of fermentable sugar for ultrasound-assisted hydrolysis. The maximum yield of fermentable sugar predicted is around 16 g.kg^{-1} for moisture content around 85wt% and temperature about 47°C . Similar yield also was obtained for moisture content around 50 wt% and temperatures ranging from 55 to 70°C . Fig. 2b presents the influence of temperature and enzyme load on the yield of hydrolysis, where it is seen that optimum temperature is around 45 - 48°C and enzyme load higher than 8.5 wt%. In other work was demonstrated that optimum temperature for cellulolytic complex used here is 47°C (Balsan et al. 2012). Fig. 2c presents the influence of moisture content and enzyme load on the yield of hydrolysis. Once more, maximum yield was obtained at moisture content around 50 wt% and enzyme load higher than 8.5 wt%. Based on the analysis of contour plots, the maximum yield for ultrasound-assisted hydrolysis obtained in this work was about 16 g.kg^{-1} at moisture content of 50 wt%, enzyme load of 8.5 wt% and temperature of 47°C . Although was not possible to generate a model for conventional hydrolysis, it is possible to affirm that the optimized condition is similar to ultrasound-assisted hydrolysis, since it was not verified significant difference in the yield among the processes. On the other hand, others searchers have obtained better results using ultrasound treatment; Yu et al. (2009) combined two pretreatments (ultrasonic and H_2O_2) in the rice hull hydrolyze to led a significant lignin degradation. Yang et al. (2012) also observed that ultrasonic treatment shorten the pretreatment step compared with untreated group.

Ang et al. (2013) obtained 15 mg.mL^{-1} of total reducing sugars using HCl in the pretreatment, thus the HCl was further optimized. Dagnino et al. (2013) studied the pretreated rice hull with sulphuric acid and the enzymatic hydrolysis, the performance was about 25%

total sugars present after 48 h of reaction. In this work was used the enzymatic hydrolysis because presented some advantages compared with the acid hydrolysis it can generate some inhibitors, this was observed in the work of Singh et al. (2014). The same authors using the enzymatic hydrolysis obtained 13.5 g.L^{-1} of sugars.

Enzymatic hydrolysis of rice hulls using supercritical CO_2 as co-solvent

Table 2 presents the results in terms of yield of hydrolysis in the eleven runs of the CCD for the enzymatic hydrolysis carried out using supercritical CO_2 as co-solvent in the reactions. Data of Table 2 were used to determine the effects of each studied variables on yield of fermentable sugar. The effects were expressed in the form of Pareto chart, which are presented in the Fig. 3. As can be see, none linear or interaction terms were statistically significant in the studied range, indicating that, independent of condition employed, the yield of hydrolysis was around 4.2 g.kg^{-1} (mean value obtained in the eleven runs). It is important to point out that the yield obtained in the reactions using supercritical CO_2 was considerably lower than that obtained in the conventional and ultrasound-assisted hydrolysis. This result can be associated with the deactivation of enzyme by the CO_2 . Although the CO_2 successfully employed to increase the catalytic power of enzymes, there are some cases where its use can lead to inactivation. Dutta et al. (2014) in their work used cellulose and xylanase activated in presence of calcium hydroxyapatite nanoparticles with concomitant increase in thermostability about 35% increment in production of xylose and reducing sugars from rice husk and rice straw compared to the untreated enzyme sets.

4.3.2 Conclusions

In this paper work was evaluated the enzymatic hydrolysis of rice hulls for production of fermentable sugar using innovative technologies such as ultrasound, supercritical CO_2 and

compared with conventional one. Maximum yield of fermentable sugar obtained was about 16 g.kg⁻¹ using conventional or ultrasound-assisted hydrolyses. The experimental condition at optimized condition was moisture content of 50 wt%, enzyme load of 8.5 wt% and temperature of 47°C. The yield obtained in the hydrolysis using supercritical CO₂ was around 4.2 g.kg⁻¹ as co-solvent. Enzymatic hydrolysis using conventional procedure showed to be the best alternative to obtain fermentable sugar from rice hulls since the innovative technologies employed did not lead to better results.

Competing interests

The authors thank CNPq and CAPES for the financial support of this work and scholarships.

4.3.3 References

- [1] R. Potumarthi, R.R. Baadhe, P. Nayak, A. Jetty, **Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars**, *Bioresource Technology* 128 (2013) 113–117.
- [2] L. R. Hickert, **Optimization of hydrolysis of rice husk (*Oryza sativa*) and assessing the ability of ethanol and xylitol bioconversion by yeasts**, M.Sc. Thesis, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 2010.
- [3] N. Pereira Jr., A.M. Castro, **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**, *Química Nova* 33 (2010) 181–188.
- [4] Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.

- [5] J.R.F. Silva, K.C. Cantelli, M.B.A. Soares, M. V. Tres, D. Oliveira, M.A.A. Meireles, J. V. Oliveira, H. Treichel, M.A. Mazutti, **Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas combined with ultrasound**, Ultrasonics Sonochemistry, Submitted for publication.
- [6] S. Branda, R.F. Susanti, S.K. Kim, H. Lee, J. Kim, B. Sang, **Supercritical ethanol as an enhanced medium for lignocellulosic biomass liquefaction: Influence of physical process parameters**, Energy 59 (2013) 173-182.
- [7] K.H. Kim, J. Hong, **Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis**. Bioresource Technology 77(2001) 139–44.
- [8] M. Gao, F. Xu, S. Li, X. Ji, S.Chen, D. Zhang. **Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion**, Biosystems Engineering 106(2010) 470–475.
- [9] S.Q. Tian, Z.Y. Wang, Z.L. Fan, L.L. Zuo, **Comparison of ultrasonic and CO₂ laser pretreatment methods on enzyme digestibility of corn stover**. International Journal of Molecular Sciences 13 (2012) 4141–52.
- [10] D. Pasquini, M.T.B. Pimenta, L.H. Ferreira, A.A.S. Curvelo, **Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water**, The Journal of Supercritical Fluids 34 (2005) 125–31.
- [11] T. Benazzi, S. Calgaroto, V. Astolfi, C. Dalla Rosa, J. V. Oliveira, M. A. Mazutti, **Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with**

ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis, *Enzyme and Microbial Technology* 52 (2013) 247–250.

[12] C. Yang, I. Sheih, T. J. Fang, **Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment**, *Ultrasonics Sonochemistry* 19 (2012) 687–691.

[13] G.L. Miller, **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**, *Analytical Chemistry* 31 (1959) 426–428.

[14] G. Balsan, V. Astolfi, T. Benazzi, M.A.A. Meireles, F. Maugeri, M. Di Luccio, V. Dal Prá, A.J. Mossi, H. Treichel, M.A. Mazutti, **Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial substrates**, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35 (2012) 1229–1237.

[15] T. N. Ang, G. C. Ngoh, A. S. M Chua, **Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk**, *Bioresource Technology* 135 (2013) 116–119.

[16] E.P. Dagnino, E.R. Chamorro, S.D. Romano, F.E. Felissia, M.C. Area. **Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production**, *Industrial Crops and Products* 42 (2013) 363–368.

[17] Singh, S. Bajar, N. R. Bishnoi, **Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture**, *Fuel* 116 (2014) 699–702.

[18] N. Dutta, A. Mukhopadhyay, A. K. Dasgupta, K. Chakrabarti, **Improved production of reducing sugars from rice husk and rice straw using bacterial cellulose and xylanase activated with hydroxypartite nanoparticles**, *Bioresource Tecnology* 153 (2014) 269–277.

List of Figure caption:

Fig. 1. Pareto Chart showing the effects of linear, quadratic and interaction terms of independent variables on the yielding of fermentable sugars obtained by conventional (a) and ultrasound-assisted hydrolysis (b).

Fig. 2. Contour plots showing the influence of independent variables in the yield for ultrasound-assisted hydrolysis: a) Influence of temperature and moisture content; b) enzyme load and temperature; c) enzyme load and moisture content. Third variable was always maintained at condition of central point.

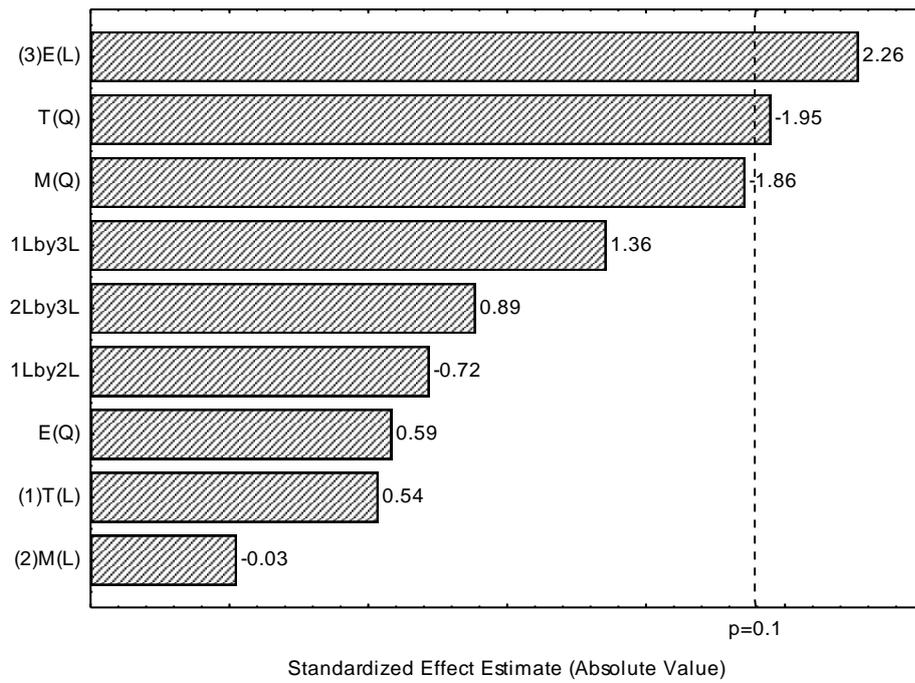
Fig. 3. Pareto Chart showing the effects of linear and interaction terms of independent variables on the yielding of fermentable sugars obtained by hydrolysis carried out using supercritical CO₂ as co-solvent.

Table 1. Matrix of the experimental results obtained in the CCRD for conventional and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of rice hulls.

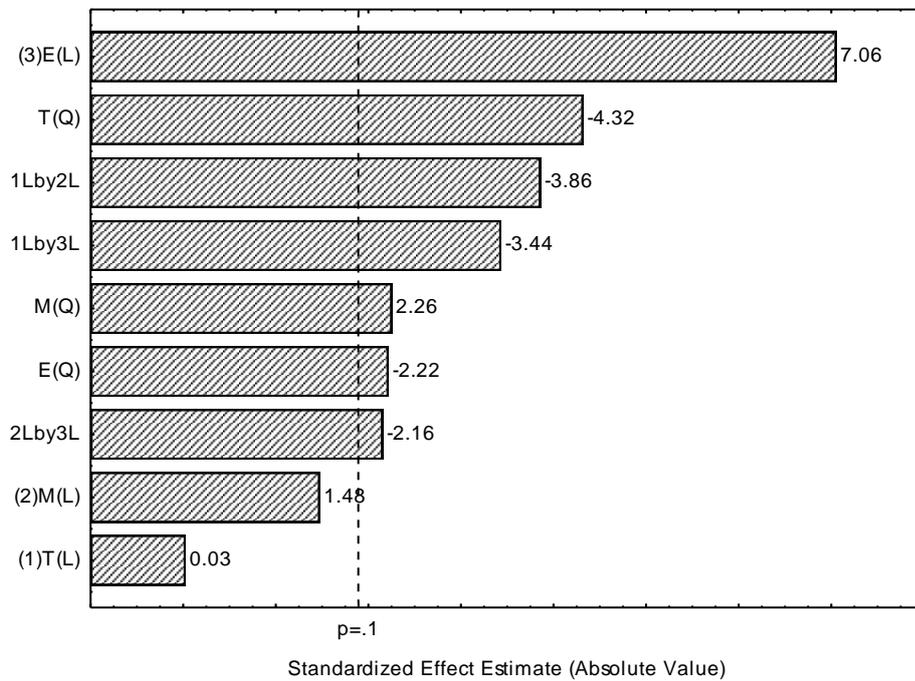
| Run | Temperature (°C) | Moisture Content (wt%) | Enzyme load (wt%) | Hydrolysis yield - Conventional (g.kg⁻¹) | Hydrolysis yield - Ultrasound (g.kg⁻¹) |
|------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|--|--|
| 1 | 46 (-1) | 58 (-1) | 2.8 (-1) | 9.6 | 5.3 |
| 2 | 64 (1) | 58 (-1) | 2.8 (-1) | 8.4 | 10.0 |
| 3 | 46 (-1) | 82 (1) | 2.8 (-1) | 7.0 | 10.2 |
| 4 | 64 (1) | 82 (1) | 2.8 (-1) | 6.5 | 10.0 |
| 5 | 46 (-1) | 58 (-1) | 8.2 (1) | 9.2 | 13.7 |
| 6 | 64 (1) | 58 (-1) | 8.2 (1) | 16.2 | 14.3 |
| 7 | 46 (-1) | 82 (1) | 8.2 (1) | 13.1 | 16.9 |
| 8 | 64 (1) | 82 (1) | 8.2 (1) | 14.2 | 7.9 |
| 9 | 40 (-1.68) | 70 (0) | 5.5 (0) | 10.7 | 6.8 |
| 10 | 70 (1.68) | 70 (0) | 5.5 (0) | 9.9 | 9.2 |
| 11 | 55 (0) | 50 (-1.68) | 5.5 (0) | 9.8 | 13.7 |
| 12 | 55 (0) | 90 (1.68) | 5.5 (0) | 11.2 | 17.0 |
| 13 | 55 (0) | 70 (0) | 1.0 (-1.68) | 15.7 | 5.2 |
| 14 | 55 (0) | 70 (0) | 10.0 (1.68) | 15.8 | 15.5 |
| 15 | 55 (0) | 70 (0) | 5.5 (0) | 12.1 | 12.9 |
| 16 | 55 (0) | 70 (0) | 5.5 (0) | 13.4 | 12.9 |
| 17 | 55 (0) | 70 (0) | 5.5 (0) | 15.0 | 12.5 |

Table 2. Matrix of the experimental results obtained in the CCD for enzymatic hydrolysis of rice hulls using supercritical CO₂ as co-solvent.

| Run | Moisture Content (wt%) | Enzyme load (wt%) | Pressure (MPa) | Yield (g.kg¹) |
|------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 48 (-1) | 5.0 (-1) | 10 (-1) | 3.7 |
| 2 | 72 (1) | 5.0 (-1) | 10 (-1) | 5.0 |
| 3 | 48 (-1) | 20.0 (1) | 10 (-1) | 6.8 |
| 4 | 72 (1) | 20.0 (1) | 10 (-1) | 4.3 |
| 5 | 48 (-1) | 5.0 (-1) | 18 (1) | 4.3 |
| 6 | 72 (1) | 5.0 (-1) | 18 (1) | 3.6 |
| 7 | 48 (-1) | 20.0 (1) | 18 (1) | 4.1 |
| 8 | 72 (1) | 20.0 (1) | 18 (1) | 5.0 |
| 9 | 60 (0) | 12.5 (0) | 14 (0) | 3.1 |
| 10 | 60 (0) | 12.5 (0) | 14 (0) | 3.6 |
| 11 | 60 (0) | 12.5 (0) | 14 (0) | 3.4 |

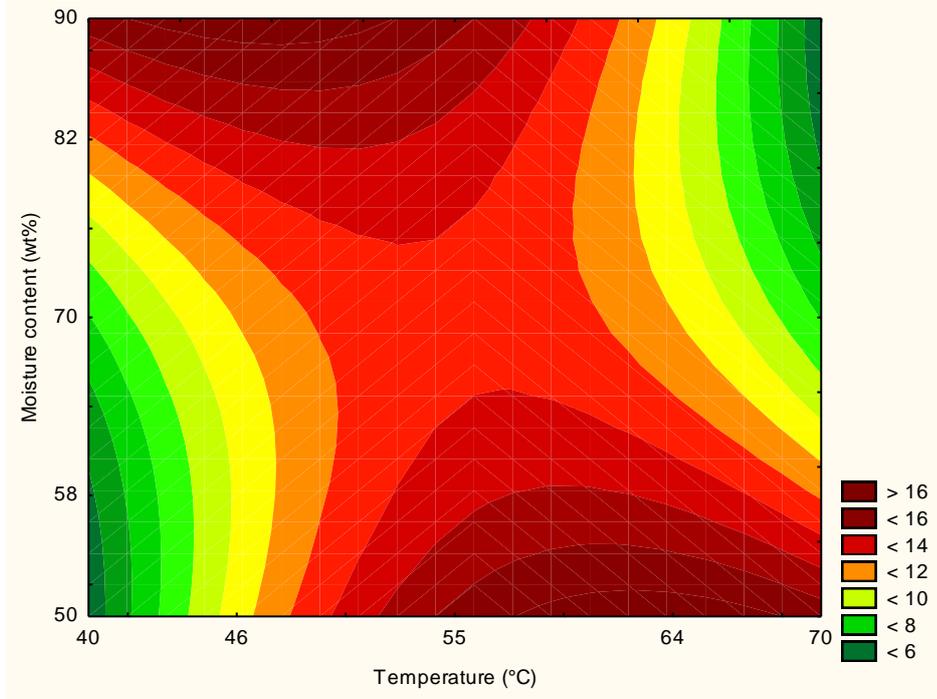


a)

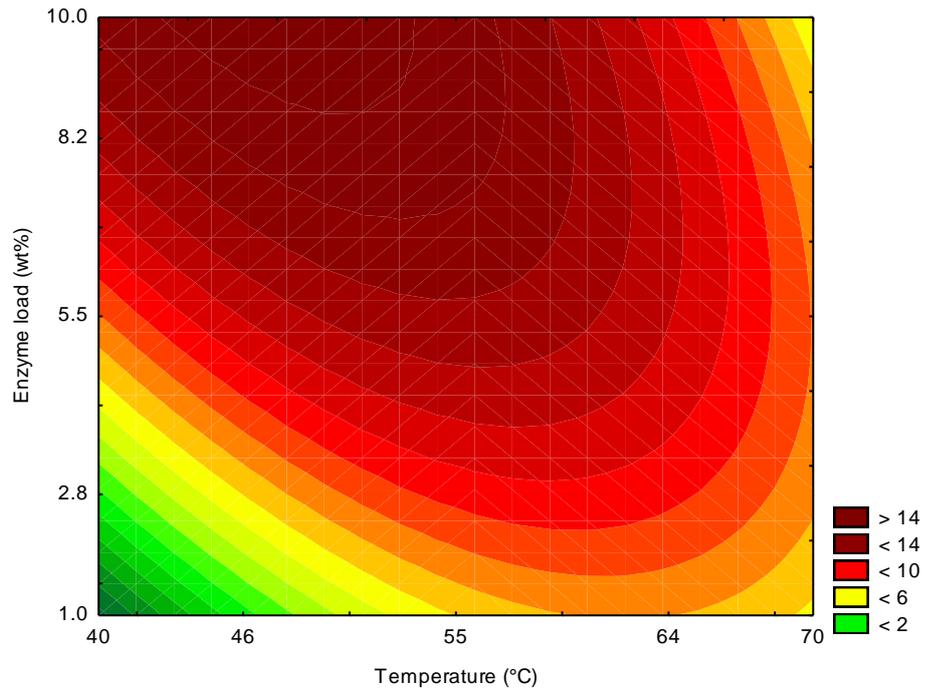


b)

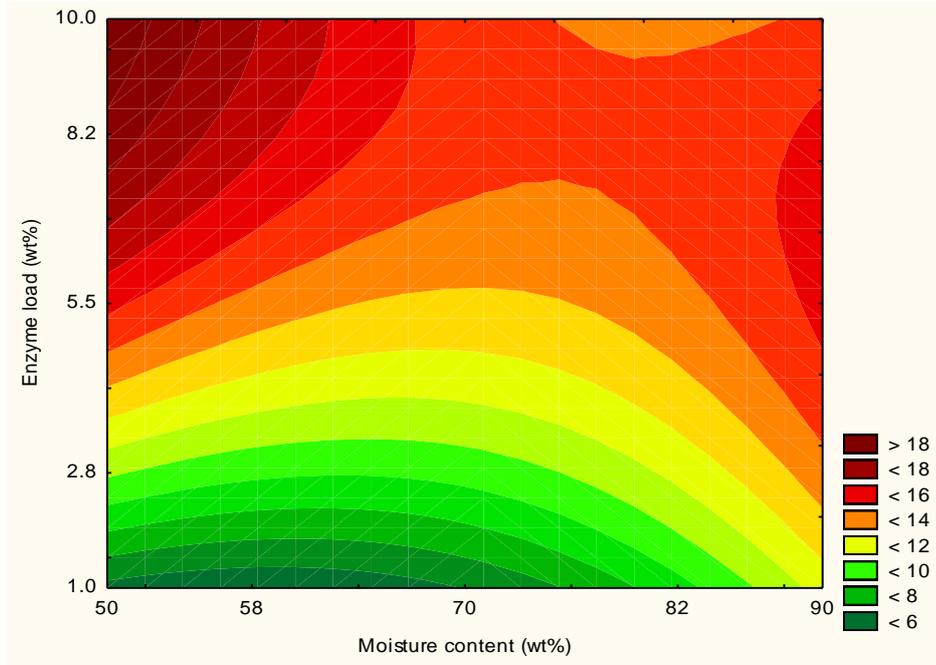
Figure 1.



a)



b)



c)

Figure 2.

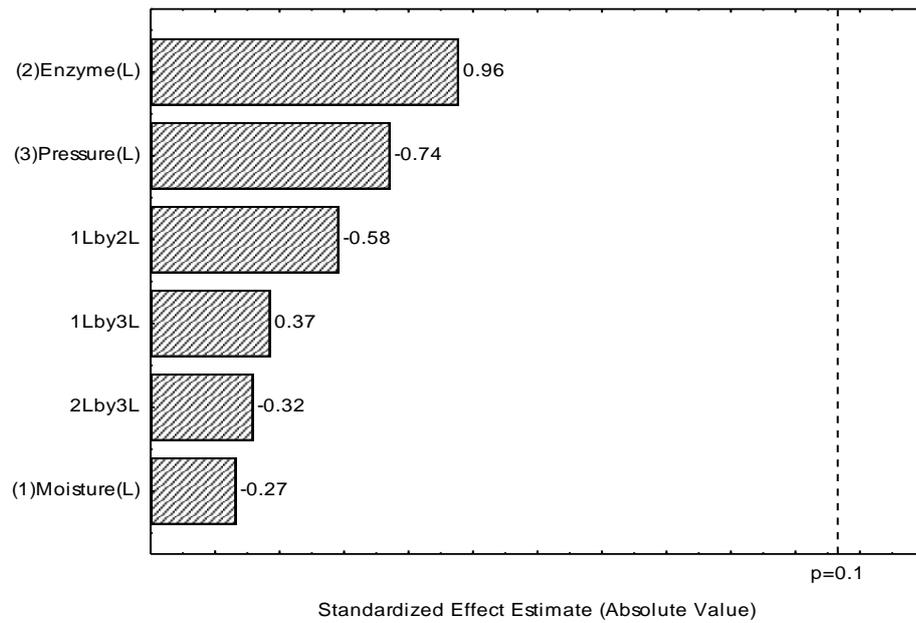


Figure 3.

5. DISCUSSÃO INTEGRADA

Os resultados obtidos nesse trabalho, apresentados na forma de dois artigos submetidos para publicações em diferentes revistas, são produto de um único e extenso trabalho que vem sendo desenvolvido desde o início de 2012, no laboratório de Bioprocessos do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Santa Maria.

Esse trabalho teve como proposta realizar hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz para obtenção de açúcares fermentescíveis usando tecnologias avançadas para tentar de alguma forma otimizar os processos já existentes, as tecnologias usadas neste trabalho foram o ultrassom e o CO₂ supercrítico.

O processo de hidrólise ácida consistiu em 17 ensaios de hidrólise ácida convencional sem tratamento prévio da casca de arroz, testadas em diferentes condições de temperatura, concentrações de ácido e umidade, e após foram realizados os mesmos ensaios, porém utilizando o banho de ultrassom. Após estes ensaios foram realizadas as análises de concentrações de açúcares para ver se ocorreram melhores resultados comparando as duas hidrólises.

Os rendimentos médios de açúcar fermentável considerando os 17 experimentos foram de 60,9 para hidrólise convencional e 79,5 g.kg⁻¹ na hidrólise assistida por ultrassom. Estes resultados mostraram que o uso do ultrassom para a hidrólise ácida da casca de arroz é uma ferramenta útil para promover o processo de intensificação. Na maior parte dos ensaios, o rendimento do açúcar fermentável na hidrólise assistida por ultrassom foi sempre maior do que para o convencional.

Nos testes de hidrólise ácida convencional de casca de arroz, as condições que atingiram melhores eficiências foi o estado otimizado onde o teor de umidade foi de 60% em peso, concentração de ácido de 18,8% em peso a uma temperatura de 65°C, sendo obtido um rendimento de 113,0 g.kg⁻¹. Já na hidrólise ácida assistida por ultrassom às condições que apresentaram os melhores rendimentos foi teor de umidade 60% em peso, concentração de ácido de 15% em peso e temperatura de 45°C, resultando num rendimento de 162,0 g.kg⁻¹.

Com base nos resultados de rendimentos de açúcares fermentáveis foi possível observar que quando usado à tecnologia de ultrassom o rendimento foi de cerca de 43% maior do que para a hidrólise convencional. Além disto, pode-se concluir que é possível obter altos

rendimentos de açúcares utilizando menos ácidos e baixas temperaturas, pois o ultrassom agiu como um intensificador do processo.

Analisando o segundo artigo, onde foi investigado o uso de tecnologias inovadoras para melhorar a hidrólise enzimática da casca de arroz, avaliou-se o uso do CO₂ supercrítico na hidrólise, após foi feita uma comparação da hidrólise enzimática convencional e hidrólise convencional assistida por ultrassom com a hidrólise enzimática utilizando o CO₂ supercrítico.

Na hidrólise enzimática convencional e assistida por ultrassom obteve-se um rendimento de 16g.kg⁻¹, enquanto que na hidrólise com o uso do CO₂ supercrítico foi de 4,2 g.kg⁻¹, tanto na hidrólise enzimática convencional como na hidrólise enzimática assistida por ultrassom não foi observado nenhuma diferença significativa em relação ao rendimento de açúcares fermentescíveis, porém quando se analisa os efeitos das variáveis nas reações de hidrólise observou um comportamento diferente da hidrólise enzimática convencional. Somente termos lineares do teor de umidade e temperatura não foram significativos ($p < 0,1$) na faixa avaliada. Novamente o termo linear para carga enzima foi o termo mais importante e indica que mais enzimas são necessárias para aumentar o rendimento. Também foi observado que a influência do termo quadrático para a temperatura no rendimento de hidrólise assistida por ultrassom era mais grave do que a convencional. Na prática, a redução do rendimento é mais grave quando a temperatura é aumentada de 40 a 70°C para as reações com banho de ultrassom, pois ultrassom é uma fonte auxiliar de energia e pode desativar a enzima. Isto foi confirmado comparando a magnitude do termo linear para a carga de enzima, onde ela é 3 vezes superior para reações assistida por ultrassom do que o convencional.

Na hidrólise enzimática usando o CO₂ supercrítico o rendimento de açúcar fermentável foi consideravelmente inferior à hidrólise enzimática convencional, estes resultados provavelmente estão associados com a desativação da enzima pelo CO₂ supercrítico. Embora que o CO₂ supercrítico seja utilizado com sucesso para aumentar o poder catalítico de enzimas, existem alguns casos em que a sua utilização pode levar à inativação.

Dessa forma, conclui-se que o uso do ultrassom para auxiliar nas hidrólises é uma ferramenta útil para intensificar as reações para a obtenção de açúcares com valores comerciais, porém o uso do CO₂ supercrítico não se mostrou muito atraente, pois o mesmo pode causar desnaturação da enzima e diminuir a eficiência do processo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

O presente trabalho, viabilizou o processo de hidrólise da casca de arroz para a obtenção de açúcares de interesses comerciais, analisou-se a hidrólise ácida e enzimática utilizando tecnologias avançadas para otimizar o processo.

As tecnologias utilizadas neste trabalho foram o ultrassom e o CO₂ supercrítico, com o intuito de analisar quais das duas teriam os melhores rendimentos de açúcares fermentáveis.

Em um primeiro momento do estudo, foi realizada hidrólise ácida convencional e assistida por ultrassom da casca de arroz, os resultados foram promissores quando usado o banho de ultrassom, obtendo-se bons rendimentos de açúcares fermentescíveis, cerca de 43% maior que o rendimento da hidrólise ácida convencional.

Na segunda parte do estudo, foi realizada a hidrólise enzimática da casca de arroz pelo método convencional e com banho de ultrassom, ambos não tiveram diferença significativa nos rendimentos de açúcares fermentescíveis.

Realizou-se também hidrólise enzimática com o uso do CO₂ supercrítico onde o rendimento de açúcar foi consideravelmente inferior quando comparado com as outras hidrólises, concluindo-se, então, que o uso do CO₂ supercrítico não é uma tecnologia promissora para melhorar a eficiência do processo de hidrólise.

Em relação ao ultrassom, tem-se conhecimento que o mesmo causa efeitos sobre a estrutura da matéria prima. Sugere-se então para trabalhos futuros, estudos mais detalhados a respeito destas estruturas para auxiliar nas conclusões a respeito dos efeitos da exposição ao ultrassom.

Seria relevante futuramente avaliar celulasas de outros micro-organismos, bem como avaliar a hidrólise com outros substratos. Realizar o monitoramento das atividades enzimáticas durante o processo de hidrólise, identificar os açúcares que são liberados no processo, identificar e avaliar se as enzimas utilizadas na hidrólise ficam adsorvidas ou não, e realizar fermentações.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus Níger***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2010.

ALVIRA, P. E, et al.. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. *Bioresource Technology*, v.101, p. 4851–4861, 2010.

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

BENAZZI, T, et al. . **Hydrolysis of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide to obtain fermentable sugars**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. V. 88, p. 1766-1768. 2013.

BEVILAQUA, et al. **Cleaner production: levulinic acid from rice husks**. *Journal of Cleaner Production* v. 47, p. 96 e 101, 2013.

BOATENG, C.O; LEE, K.T . **Ultrasonic-assisted simultaneous saccharification and fermentation of pretreated oil palm fronds for sustainable bioethanol production**. *Fuel*, v. 119; p.285–291, 2014.

CALHEIROS, M.N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz (Dissertação de mestrado)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

CASTRO, A. M; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol. 33, n. 1, 181-188, 2010.

CECHIN, J, et al. **O processo de reutilização da casca do arroz: um estudo de caso na empresa J. Fighera & cia. Ltda**. *REGET* - v. 17 n. 17 p. 3293 – 3305, Dez. 2013.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. F. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 438–443, Aug. 2003.

FERREIRA, S.M, et al. **Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.15, n.4, p.383-390, 2013.

FURIGO Jr., A. **Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.

GÁMEZ, S., G. CABRIALES, J. J., RAMÍREZ, J.A., Garrote, G., 2006. **Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid.** J. Food Eng. 74, 78-88.

GARCÍA, A.; et al. **Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production.** Industrial Crops and Products, V.53, p. 148-153, 2014.

GOLDEMBERG, J. Em Bioenergia no Estado de São Paulo, Nigro, F.E.B; Coelho, S.T., Eds.; Imprensa Oficial do Estado de São Paulo , p.110. São Paulo 2008.

HELLO, K. M, et al. **Cellulose hydrolysis over silica modified with chlorosulphonic acid inone pot synthesis.** Applied Catalysis A: General ,v.475 . pg. 226–234, 2014.

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

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

ISROI, M.M.I; TAHERZADEH, M.J . **Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB).** Bioresource Technology, v. 165, p. 9-12, 2014.

J.W. KIM, G. MAZZA. **Optimization of phosphoric acid catalyzed fractionation and enzymatic digestibility of flax shives.** Industrial Crops and Products, V.28, p.436-355, 2008.

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

LEAES, E.X, et al. **Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars.** Biosystems Engineering, V.115, p. 1-6 , 2013.

LEAES, E.X, et al. **Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.2, p. 21–25, 2013.

LEE,H.S, et al. **Starch Hydrolysis Using Enzyme In Supercritical Carbon Dioxide.** Biotechnology Techniques, V. 7, N.4,pp.267, 1993.

LI,M, et al. **Biodiesel production from waste cooking oil using a heterogeneous catalyst from pyrolyzed rice husk.** Bioresource Technology. V. 154 ,p.345–348, 2014.

LINARES, J.C.L, et al. **Fermentable sugar production from rapeseed straw by dilute phosphoric acid pretreatment.** Journal of Cleaner Production, v. 66 ; p. 555 e 561, 2014.

LORENZETT, D.B; NEUHAUS, M; SCHWAB, N.T. **Gestão de resíduos e a indústria de beneficiamento de arroz.** Revista Gestão Industrial. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil. v. 08, n. 01: p. 219-232, 2012.

LUO, J ; FANG, Z ; SMITH JR, R.L **.Review: Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 41, p. 56 e 93, 2014.

MELO, S.S.**Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com dióxido de carbono sub e supercrítico para uma produção eficiente de bioetanol por hidrólise enzimática (Dissertação de mestrado).** Universidade de São Paulo – USP, 2013.

MONTIPÓ,S, et al. **Bioconversão de hidrolisado da casca de arroz a Ácido Láctico.** II WSPI – Workshop em Sistemas e Processos Industriais, Santa Cruz do Sul, RS, 8 – 10 de maio de 2013.

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

MOORE, S.; SAMDANI, S; ONDREY, G.; PARKINSON, G. **New roles for supercritical. Chemical engineering,** p 32 – 35, 1994.

MURATOV, G.; KIM, C. **Enzymatic Hydrolysis of Cotton Fibers in Supercritical CO₂.** Biotechnol. Bioprocess Eng. , V. 7, p. 85-88, 2002.

NEGRO, M.J, et al. **Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst**. Bioresource Technology, v. 153, p.101–107, 2014.

NOVA CANA. A produção de etanol a partir do grão de arroz. Disponível em <<
<http://www.novacana.com/n/etanol/alternativas/producao-etanol-arroz-200213/##>>>
Acessado dia 07 de abril de 2014.

OGEDA, T.C; PETRI, D.F.S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Química Nova, vol 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. L. et al.,. **Hidrólise enzimática do BCA tratado com CO₂ sub e supercrítico**. 21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2013.

OROZCO, A.M, et al. **Dilute phosphoric acid-catalysed hydrolysis of municipal bio-waste wood shavings using autoclave parr reactor system**. Bioresource Technology v.102 . p. 9076–9082. , 2011.

PEREIRA, J.E.S. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática**. Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

PINTO, B ; CALLONI, G; SILVA, S.A. **Obtenção de acetato de celulose a partir da casca de arroz (Oryza sativa)**. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, jan./jun. 2013.

PLANETA ARROZ, notícias Safra 2013/14 será de 12,25 milhões de toneladas de arroz em casca. Disponível em <<
http://www.planetaarroz.com.br/site/noticias_detalle.php?idNoticia=12469>>
Acessado dia 07 de abril de 2014.

PORTO, C; DECORTI, D; NATOLINO, A. **Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal**. J. of Supercritical Fluids, v.87 ; p.1–8., 2014.

POTUMARTHI, R; BAADHE, R.R.; P. NAYAK, A. JETTY. **Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars**, Bioresource Technology V.128, p. 113–117, 2013.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

REHMANA, M.S.U, et al. . **Sono-assisted sulfuric acid process for economical recovery offermentable sugars and mesoporous pure silica from rice straw**. *Industrial Crops and Products* v. 49 , p.705– 711 ,2013.

RESA, P; BUCKIN, V. **Ultrasonic analysis of kinetic mechanism of hydrolysis of cellobiose by b-glucosidase**. *Analytical Biochemistry* , v.415, p. 1–11, 2011.

REYES,J; ZAMORA,P.P; DURÁN, N. **Hidrólise Enzimática de Casca de Arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos Químicos e Fotoquímicos**. *Química Nova*, 21 (2) 1998.

SANTOS, A. L. F ; KAWASE, K.Y. F; COELHO, G.L.V. **Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide**. *The Journal of Supercritical Fluids*, V. 56, p. 277-282, 2011.

SHARIF A,K.M, et al. **Experimental design of supercritical fluid extraction – A review**. *Journal of Food Engineering*, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHEN, F. et al. **Enzymatic saccharification coupling with polyester recovery from cotton-based waste textiles by phosphoric acid pretreatment**. *Bioresource Technology* ,v.130 ,p.248–255, 2013.

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

SILVA, A. S, et al. **Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation**. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7402–7409, 2010.

SILVA, J.R.F. **Hidrólise Enzimática de Material Lignocelulósico utilizando Fluidos Pressurizados**. Exame de qualificação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Uri- Campus Erechim. 2011.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123f. (Mestrado em Ciências) Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, J.R.F, et al. **Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 2 , p.102–107, 2013.

SINGH, A , SOMVIR BAJAR A, NARSI R. BISHNOI . **Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture.** . *Fuel* , v. 116, p.699–702, 2014.

SINGH, R, et al. **A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential** . *Renewable and Sustainable Energy Reviews* . v. 32. P. 13–728. 2014.

SOUZA, M, et al. **Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry* , vol. 20, p. 89-94 , 2013.

SUBHEDAR, P.B ; GOGATE, P.R . **Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations** .*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , v. 101 p. 108– 114, 2014.

TORO, F.P.C, et al. **Integrated supercritical fluid extraction and subcritical waterhydrolysis for the recovery of bioactive compounds frompressed palm fiber.** *J. of Supercritical Fluids* , 2014.

VASCONCELOS, S.M, et al. **Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery.** *Bioresource Technology* v.135. p. 46–52, 2013.

VÁZQUEZ, M, et al. **Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production.** *Bioresource Technology* , v. 98 , p. 3053–3060, 2007.

WERLE, L.B, et al. **Ultrasound-assisted acid hydrolysis of palm leaves (*Roystonea oleracea*) for production of fermentable sugars.** *Industrial Crops and Products* vol. 45 , p.128– 132, 2013.

WIMMER, Z; ZAREVÚCKA, M. **Review:A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity.** *Int. J. Mol. Sci.* V. 11, p. 233-253, 2010.

YALDAGARD, M ; MORTAZAVI, S.A ; TABATABAIE, F . **The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase activity.** *Korean J. Chem. Eng.*, v. 25(3), p. 517-523 ,2008.

YANG A, et al .Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. Ultrasonics Sonochemistry, v. 19 , p. 687–691, 2012.

YU, Z.L, et al. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin . Ultrasonics Sonochemistry , v. 21 ; p. 930–936, 2014.

YUNUS, R, et al. Effect of ultrasonic pre-treatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. Bioresour Technol. V. 101, p. 9792 e 6, 2010.

ZHANG ,J, et al.. Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnology Advances , v. 28, p.613–619, 2010.

ZHANG, et al. An efficient enzymatic modification of cordycepin in ionic liquids under ultrasonic irradiation. Ultrasonics Sonochemistry ,2014.