

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA**

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE
ÁCIDO ITACÔNICO
A PARTIR DA CASCA DE ARROZ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Giovanni Bressiani Pedroso

Santa Maria, RS, Brasil

2014

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO ITACÔNICO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ

por

Giovanni Bressiani Pedroso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em Química Analítica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química.

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

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

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO ITACÔNICO
A PARTIR DA CASCA DE ARROZ**

elaborada por
Giovanni Bressiani Pedroso

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ayrton Figueiredo Martins, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Marcelo Gonçalves Montes D'Oca, Dr. (FURG)

Santa Maria, 24 de Março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins pelas orientações, ensinamentos e pela oportunidade em fazer parte deste excelente grupo de pesquisa do LATER.

Ao prof. Osmar Damian Prestes e Renato Zanela, ambos do LARP, por possibilitarem as análises cromatográficas em UHPLC-MS/MS.

Ao prof. Marcio Schwab, pela paciência e preciosos conhecimentos acerca das ferramentas estatísticas multivariadas utilizadas ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas do LATER pelo auxílio e apoio constante. Em especial nomeio Sheila Montipó, de quem obtive suporte para dar início aos experimentos, e Daiane Skupin, que prestou importantes conselhos e ajuda ao longo de todo o trabalho. Bem como ao aluno de iniciação científica Michael Philippsen, por sua dedicação em tempo e companhia.

Aos meus estimados familiares, principalmente meus pais Jurandir João de Sousa Pedroso e Elizabethe Bressiani Pedroso que, por doação irrestrita às minhas necessidades e ao meu desenvolvimento ao longo de toda a vida, me permitiram estar hoje concretizando este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiador deste projeto.

Dedico irrestritamente esta dissertação à minha esposa e amável companheira Daiane, da qual obtive força e entusiasmo para concluir esta etapa.

RESUMO

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

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO ITACÔNICO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ

AUTOR: GIOVANNI BRESSIANI PEDROSO
ORIENTADOR: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS
Santa Maria, 24 de março de 2014.

A casca de arroz (CA) pode ser considerada matéria-prima lignocelulósica abundante na região sul-brasileira, renovável e quase sem valor comercial - passível de bioconversão em produtos de grande interesse industrial e farmoquímico. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o aproveitamento da CA na produção de ácido itacônico (AI) e, simultaneamente, contribuir para a mitigação de grave problema ambiental oriundo da disposição imprópria deste resíduo de beneficiamento. Para tanto, a CA foi submetida à hidrólise ácida à pressão segundo planejamento estatístico multivariado, usando-se delineamento composto central rotacional (DCCR) para as hidrólises com HNO_3 e H_3PO_4 diluídos. Os experimentos revelaram que, a $145\text{ }^\circ\text{C}$ e 28 min de reação, com 3,4% ($v\ v^{-1}$) H_3PO_4 , foram produzidos $44,4\text{ g}$ de açúcar L^{-1} , com rendimento de $266,4\text{ mg}$ de açúcar g^{-1} CA. Empregando-se 3,76% ($v\ v^{-1}$) HNO_3 , a melhor condição experimental foi $135\text{ }^\circ\text{C}$ e 35 min de reação, produzindo-se $42,0\text{ g}$ açúcar L^{-1} , com rendimento de $252,0\text{ mg}$ de açúcar g^{-1} CA. Comparados a resultados de hidrólises com HCl de trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo, os resultados foram superiores, considerando-se a liberação concomitante de glicose, xilose e arabinose. Nenhum benefício adicional foi obtido, porém, com o pré-tratamento da CA com NaOH e NH_4OH . Ensaio fermentativos prévios foram feitos com o intuito de encontrar-se as condições mais adequadas ao crescimento do fungo *Aspergillus terreus* (ATCC 7860) no hidrolisado de CA, submetendo-se o processo fermentativo a planejamento experimental composto central, em blocos, avaliando-se as variáveis pH inicial do meio, temperatura, uso de extrato de levedura (EL) e origem da CA. Utilizaram-se frascos de 20 mL para os experimentos em batelada. O melhor experimento foi aquele que produziu $1,9\text{ g}$ AI L^{-1} , com rendimento de 132 mg AI g^{-1} açúcares (ou $11,4\text{ mg}$ AI g^{-1} CA), usando-se hidrolisado clorídrico (0,8% HCl $v\ v^{-1}$), temperatura de $145\text{ }^\circ\text{C}$ e 46 min de reação; destoxificação com CaO, meio de fermentação 50:50 hidrolisado : solução de dextrose de batata, com $10,0\text{ g}$ EL $^{-1}$, pH inicial 6,0, 152 h de fermentação). As técnicas analíticas utilizadas foram HPLC-DAD e -RID, e Espectrofotometria UV-vis, apresentando-se figuras-de-mérito e validação das metodologias desenvolvidas. Foi possível demonstrar a viabilidade do processo de produção de AI a partir da CA, em escala de laboratório, contribuindo-se para o esforço do desenvolvimento da pesquisa biotecnológica e da inovação científica.

Palavras-chave: Casca de arroz. Hidrólise ácida à pressão. *Aspergillus terreus*. Ácido itacônico. Otimização multivariada de processos. Cromatografia líquida.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

BIOTECHNOLOGICAL ITACONIC ACID PRODUCTION FROM RICE HUSK

AUTHOR: GIOVANNI BRESSIANI PEDROSO

ADVISER: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS

Santa Maria, March 24th, 2014.

Rice Husks (RH) can be regarded as an abundant lignocellulosic raw material in the Brazilian southern (see for some regions of RS, SC and PR) South region, a renewable and practically without economic added value – able to be bioconverted into industrial and pharaceutical products of great interest. The main objective of this dissertation was to search the use of RH for the production of itaconic acid (IA) and, simultaneously, to contribute to the mitigation of a serious environmental problem arising from the improper disposal of the processing residues. For this, RHs were submitted to pressurized acid hydrolysis with diluted HNO_3 and H_3PO_4 in accordance with a statistical multivariate planning using Central Composite Rotatable Design (DCCR). The experiments showed that, at 145 °C and reaction time of 28 min, with 3,4% ($v v^{-1}$) H_3PO_4 , it was produced 44,4 g sugar L^{-1} , by yield of 266,4 mg sugar g^{-1} RH. By using 3,76% ($v v^{-1}$) HNO_3 , the best experimental was 135 °C and reaction time of 35 min, resulting on a 42,0 g sugar L^{-1} , by yield of 252,0 mg sugar g^{-1} RH. Compared to the results obtained before in our group for chloridric RH hydrolysis, the outcomes of this work were better, considering the concomitant liberation of glucose, xylose and arabinose. However, no additional benefit was found by applying a RH pretreatment with NaOH and NH_4OH . Previous fermentative tests were made to find the best conditions for the growth of the *Aspergillus terreus* (ATCC 7860) fungus in RH hydrolysate, submitting the fermentative process to a central compound experimental design in blocks, evaluating the variables initial pH, temperature, use of yeast extract (YE) and RH origin. 20 mL flasks were used for the batch experiments. The best experiment produced 1,9 g IA L^{-1} , by yield of 132 mg IA g^{-1} sugars (or 11,4 mg IA g^{-1} RH), using chloridric hydrolysate (0,8% $\text{HCl } v v^{-1}$), 145 °C and reaction time of 46 min; detoxification with CaO, fermentation medium 50:50 hydrolysate : potato dextrose solution, with 10,0 g YE L^{-1} , initial pH 6,0, 152 h fermentation). The used analytical techniques were HPLC-DAD and -RID, and UV-visible spectrophotometry, including the figures-of-merit and validation of the developed methodologies. It was possible to demonstrate the viability of the production processes of IA from RH, in laboratory scale, contributing to the efforts to the development of the biotechnological research and scientific innovation.

Keywords: Rice husks. Pressurized acid hydrolysis. *Aspergillus terreus*. Itaconic acid. Multivariate optimization process. Liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de bioetanol no mundo no ano de 2013.....	6
Figura 2 – Estrutura lignocelulósica recalcitrante contendo celulose, hemicelulose e lignina.	8
Figura 3 – Estrutura simplificada para biorrefinaria com base em biomassa de composição lignocelulósica.	10
Figura 4 – Grupos de pesquisa brasileiros pesquisando o aproveitamento de materiais lignocelulósicos.	11
Figura 5 – Pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas.	12
Figura 6 – Constituição do arroz, sendo casca (20%), farelo (8%) e grão (72%).....	15
Figura 7 – Lista dos compostos usados como plataformas de biomassa.	18
Figura 8 – Lista dos compostos produzidos a partir do Al.....	19
Figura 9 – Rota biosintética do Al evidenciando pontos-chave.....	22
Figura 10 – Fluxograma experimental da produção de ácido itacônico a partir da casca de arroz.....	26
Figura 11 – Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) <i>in natura</i> ; b) cominuída.....	27
Figura 12 – Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida da casca de arroz. Componentes: 1) vaso de teflon; 2) moedor de aço inox; 3) sistema de aquecimento/resfriamento; 4) controlador de temperatura.....	29
Figura 13 – Caixa-de-luvas empregada na manipulação do micro-organismo: 1) fluxo de N ₂ , 2) caixa-de-luvas (Glovebox).	32
Figura 14 – Plaqueamento do fungo <i>A. terreus</i> em meio Mueller-Hinton, indicando que as placas estão isentas de contaminação bacteriana.	33
Figura 15 – Processo fermentativo em semi-micro escala.	33
Figura 16 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional empregando ácido fosfórico, com os fatores resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c).	50
Figura 17 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional empregando ácido nítrico, com os fatores resposta para glicose (a), xilose (b) e arabinose (c).	51
Figura 18 – Curvas de contorno para a concentração de xilose (g L ⁻¹) (a) e arabinose (b) envolvendo tratamentos com H ₃ PO ₄ em função do tempo x concentração de ácido e temperatura x concentração de ácido.....	52
Figura 19 – Curvas de contorno para a concentração de xilose (g L ⁻¹) envolvendo tratamentos com HNO ₃ em função do tempo x concentração de ácido e temperatura x concentração de ácido.....	54
Figura 20 – Concentração média dos produtos de interesse e subprodutos formados durante o processo hidrolítico empregando-se H ₃ PO ₄ (a) e HNO ₃ (b) conforme as condições do planejamento experimental.	56
Figura 21 – Avaliação da etapa de destoxificação do hidrolisado de CA através de processo fermentativo com <i>A. terreus</i>	59
Figura 22 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de amostra em branco (a), de soluções-padrões (1 g L ⁻¹) de ácido itacônico e açúcares glicose, xilose e arabinose (b), e do monitoramento da fermentação com produção de Al no meio, em sistema HPLC-RID.....	61
Figura 23 – Cromatograma em modo MRM de soluções padrão de 20 µg mL ⁻¹ via UHPLC-MS/MS.....	62

Figura 24 – Cinética do processo fermentativo, a 30 °C, evidenciando o consumo de glicose x tempo de fermentação.	66
Figura 25 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento fatorial com três variáveis independentes, analisando o resultado do processo fermentativo em 168 h, com todos os efeitos (a) e apenas com os dois mais significativos (b).	67
Figura 26 – Cinética do processo fermentativo, a 26 °C (a) e a 34 °C (b), evidenciando o consumo de glicose x tempo de fermentação.	70
Figura 27 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento fatorial com duas variáveis independentes, analisando o resultado do processo fermentativo em 120 h para o 2º bloco e 96 h para o 3º bloco.	72
Figura 28 – Curva de contorno para o consumo de glicose (%) envolvendo os processos fermentativos a 26°C e 34°C.	73
Figura 29 – Cinética da produção de ácido itacônico e consumo de açúcares (g L ⁻¹) via fermentação com <i>A. terreus</i> a partir de hidrolisado da casca de arroz com 0,82% de HCl, 145 °C por 46 min.	77
Figura 30 – Cinética da produção de ácido itacônico e consumo de açúcares (g L ⁻¹) via fermentação com <i>A. terreus</i> em meio utilizando-se hidrolisado otimizado com (a) e sem (b) adição de glicose.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química aproximada de algumas biomassas.....	7
Tabela 2 – Produção de arroz dos maiores estados produtores brasileiros.....	16
Tabela 3 – Micro-organismos produtores de Al.....	20
Tabela 4 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento da glicose, xilose e arabinose.....	30
Tabela 5 – Valores utilizados no primeiro bloco do delineamento composto central para a determinação do rendimento do ácido itacônico.	34
Tabela 6 – Valores utilizados no segundo e terceiro blocos do delineamento composto central, com pontos axiais, para a determinação do rendimento do ácido itacônico.	35
Tabela 7 – Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise e fermentação.....	36
Tabela 8 – Condições cromatográficas (HPLC-DAD) utilizadas na determinação de ácido itacônico, fórmico, acético e 5-HMF.....	38
Tabela 9 – Condições cromatográficas (UHPLC-MS/MS) utilizadas na identificação de ácido itacônico.....	39
Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a determinação dos analitos e subprodutos.	42
Tabela 11 – Figuras de mérito para determinação analítica por HPLC-DAD.	43
Tabela 12 – Figuras-de-mérito para a determinação de glicose.	43
Tabela 13 – Resultados do delineamento composto central rotacional, para o ácido fosfórico, com os fatores resposta.	45
Tabela 14 – Resultados do delineamento composto central rotacional, para o ácido nítrico, com os fatores resposta.	46
Tabela 15 – Análise de variância para o emprego de ácido fosfórico.	47
Tabela 16 – Análise de variância para o emprego de ácido nítrico.	48
Tabela 17 – Resultados do delineamento experimental fatorial (sem pontos axiais), visando o consumo de glicose como fator resposta, a 168 h.....	65
Tabela 18 – Análise de variância para o processo fermentativo a 30 °C.	68
Tabela 19 – Resultados do delineamento experimental, para três variáveis, visando o consumo de glicose como fator resposta, a 120 h para 2ºbloco e 96 h para o 3ºbloco (Desvio padrão = $\pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$).....	69
Tabela 20 – Análise de variância para os processos fermentativos.....	72
Tabela 21 – Fermentação comparativa entre cepas de <i>A. terreus</i> , substratos fermentativos e produção de Al, com o tempo e pH para cada processo.....	75
Tabela 22 – Avaliação econômica da produção de Al a partir da casca de arroz.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AFEX – processo de explosão a vapor com amônia, do inglês *ammonia fiber explosion*
- AI – ácido itacônico
- ANOVA – análise de variância, do inglês *analysis of variance*
- API – ácido poli-itacônico
- ATCC - espécime da coleção de culturas norte-americana, do inglês *American Type Culture Collection*
- BDA – ágar batata dextrose
- CA – casca de arroz
- CAD – cis-aconitase descarboxilase
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- DCCR – delineamento composto central rotacional, do inglês *Central Composite Rotatable Design*
- EL -- extrato de levedura
- ESI+ – modo positivo de ionização por eletrospray (forma de injeção em LC-MS)
- EUA – Estados Unidos da América
- FAO – Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, do inglês *Food and Agriculture Organization*
- GOD – glicose oxidase
- HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *high performance liquid chromatography with diode array detector*
- HPLC-RID – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração, do inglês *high performance liquid chromatography with refractive index detector*
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade de Tecnologia
- LAPEMI – Laboratório de Pesquisas Micológicas
- LARP – Laboratório de análises de Resíduos e Pesticidas
- LATER – Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos
- LC-MS/QqQ – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com detector triplo quadrupolo, do inglês *liquid chromatograph with triple quadrupole mass spectrometry*

LD – limite de detecção

LHW - tratamento com água quente, do inglês *liquid hot water*

LQ – limite de quantificação

m/z – relação massa/carga

MA – Maranhão

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCE – membrana em ester celulose

MRM – Modo de monitoramento múltiplo de reação, do inglês, *Multiple Reaction monitoring*, usado em analisadores de massa do tipo MS/MS

P.A. – padrão analítico

P&D – Pesquisa & Desenvolvimento

POD – peroxidase

r^2 – coeficiente de determinação

RS - Rio Grande do Sul

RSM – planejamento estatístico por superfície de resposta, do inglês *response surface methodology*

S/N – sinal/ruído

SC – Santa Catarina

TFMTMPTFE – politetrafluoretileno

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFRG – Universidade Federal de Rio Grande

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UHPLC-MS/MS – cromatografia líquida de alta performance acoplado a detector de espectrometria de massas sequencial, do inglês *ultra high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry detector*

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UNIOESTE – Universidade estadual do Oeste do Paraná

USP – Universidade de São Paulo

λ – comprimento de onda

5-HMF – 5-hidroximetil-furfural

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 BIORREFINARIA	4
2.1.1 Biomassa lignocelulósica	6
2.2 ÁCIDO ITACÔNICO	17
2.3 FERMENTAÇÃO FÚNGICA	20
2.3.1 Micro-organismos produtores de ácido itacônico	20
2.3.2 Modos de fermentação	23
2.4 EMPREGO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 PRÉ-TRATAMENTO DA CASCA DE ARROZ	27
3.1.1 Pré-tratamento químico	28
3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ	28
3.2.1 Otimização do processo hidrolítico	29
3.2.2 Tratamento do hidrolisado	30
3.2.3 Destoxificação do hidrolisado	31
3.3 MANUTENÇÃO E INÓCULO DE ASPERGILLUS TERREUS	31
3.4 FERMENTAÇÃO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ	33
3.4.1 Otimização do processo fermentativo	34
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	35
3.5.1 Determinação analítica por HPLC-RID	35
3.5.2 Determinação da glicose por método enzimático	36
3.5.3 Determinação analítica por HPLC-DAD	37
3.5.4 Determinação analítica por UHPLC-MS/MS	38
3.6 CÁLCULOS DE RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE	39
3.7 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	41
4.1.1 Métodos cromatográficos	41
4.1.3 Determinação com HPLC-DAD	42
4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ	44
4.2.1 Otimização da hidrólise ácida	44
4.2.2 Análise dos produtos de interesse e subprodutos	55
4.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DA CASCA DE ARROZ	60
4.3.1 Determinação analítica dos produtos e subprodutos	60
4.3.2 Detecção do ácido itacônico por LC-MS/QqQ	62
4.3.3 Otimização da produção de ácido itacônico	63
4.3.4 Acompanhamento da cinética da produção fermentativa de AI	74
4.4 AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO	80
5 CONCLUSÕES	82
6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE	95

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente escassez de combustíveis fósseis e o reconhecimento dos danos ambientais decorrentes do seu amplo uso, faz-se necessária a busca por fontes renováveis de energia e matéria-prima industrial. O aproveitamento de biomassas alternativas é, ao mesmo tempo, oportunidade e desafio, que se concretizam na criação de novo conceito de beneficiamento, a “biorrefinaria” que é capaz de converter biomassa em produtos químicos e combustíveis (RODRIGUEZ, 2011; BOZELL & PETERSEN, 2010).

A biomassa pode ser qualquer resíduo ou rejeito lignocelulósico das atividades humanas com potencial de aproveitamento industrial, desde que submetida a algum tratamento capaz de romper as fortes ligações que unem celulose, hemicelulose e lignina, permitindo a extração de diversos compostos com valor econômico agregado (MENON & RAO, 2012).

A casca de arroz (CA), biomassa residual promissora, resulta do beneficiamento do arroz, alimento básico para cerca da metade da população mundial. A CA vem recebendo crescente atenção porque corresponde a 20% do peso total dos grãos colhidos e, principalmente, porque considera o volume da produção de arroz brasileira. Na safra 2012/2013, a produção brasileira ficou em torno de 11,9 milhões de toneladas (aumento de 2,8% em relação à safra 2011/2012); 66,3% deste valor devem-se ao estado do Rio Grande do Sul (MAPA, 2013). Portanto, 1,58 milhão de toneladas de casca de arroz, com considerável potencial poluente, requer destinação adequada. Encontrar aplicações para essa biomassa não só reduz o grande impacto ambiental decorrente, como pode diminuir o consumo de combustíveis fósseis, evidenciando, ainda, a capacidade de geração de valor agregado a um resíduo indesejado.

O ácido itacônico (AI) é um insumo industrial de crescente importância, que encontra no conceito de biorrefinaria a característica de vir a ser um dos principais produtos oriundos de biomassa com real capacidade de produção e de utilização pela indústria. Seu emprego como monômero para a produção de poli(ácido itacônico) já se encontra estabelecido bem como os diversos usos na indústria petroquímica, farmacêutica e alimentícia (KLEMENT & BÜCHS, 2013).

Todavia, a produção de AI baseia-se na via biotecnológica, empregando fungos e bactérias capazes de, via fermentativa, excretar AI no meio. Os custos dessa abordagem são elevados rapidamente caso o custo da matéria-prima seja alto, o que pode chegar a inviabilizar a relação produtiva de custo-benefício) (TEVZ, BENCINA & LEGISTA, 2010). Assim, o emprego da CA como substrato alternativo para a produção de ácidos orgânicos, como AI, ganha ainda maior destaque por conciliar soluções técnicas e ambientais relevantes atualmente.

Contudo, para que a CA possa ser efetivamente utilizada como fonte de açúcares fermentescíveis, os componentes lignocelulósicos que integram a CA precisam ser previamente segregados. Várias abordagens estão estabelecidas ou, ainda, estão recebendo intenso destaque em pesquisa ao redor do mundo. Dentre essas, encontram-se as abordagens físico-químicas, enzimáticas ou químicas, aqui destacando o emprego das hidrólises ácidas (ALVIRA *et al*, 2010). Embora não seja uma nova abordagem sobre a biomassa, a utilização de hidrólises continua demandando esforços de pesquisa, haja vista a necessidade de uma conversão eficiente de todos os carboidratos existentes no hidrolisado. Faz-se igualmente necessária a compreensão oriunda do conceito de biorrefinaria de que, adicionalmente ao já exposto, é preciso considerar a utilização efetiva de todos os componentes advindos dos materiais lignocelulósicos com o intuito de minimizar desperdícios e, assim, competir de maneira eficaz com as opções tradicionais.

A ampliação da compreensão da sociedade para as questões ambientais e de sustentabilidade concomitantemente aos conceitos de química verde geram destaque para propostas de rotas alternativas, como a via fermentativa produtora de insumos a partir de biomassa. Há interesse, tanto por parte da indústria como pelos possíveis avanços científicos gerados, por essa linha de pesquisa para que cresçam rapidamente os segmentos consumidores de fontes lignocelulósicas capazes de produzir biopolímeros, biocombustíveis e outros insumos como energia e alimentos.

Tal tema ganha maior destaque e merece receber respaldo e investimento em países produtores de grandes volumes de biomassa, como o caso do Brasil.

1.1 Objetivo

O presente trabalho tem como principal objetivo investigar o aproveitamento da CA proveniente do processo de beneficiamento do arroz, almejando a bioconversão em AI a partir de hidrolisados desta biomassa e, dessa forma, contribuir para a mitigação do crescente problema ambiental decorrente da disposição irregular de resíduos agroindustriais do RS.

Os objetivos específicos compreendem:

- ❖ desenvolver processo inovador de produção de AI, em escala semi-micro, em laboratório analítico-ambiental (não-microbiológico), com ênfase na redução do consumo de reagentes, efluentes e resíduos gerados, e no número de etapas do processo;
- ❖ desenvolver metodologia analítica adequada para a quantificação de açúcares e ácidos orgânicos, bem como de subprodutos formados;
- ❖ identificar possíveis diferenças na CA provenientes do beneficiamento a que são submetidas, determinando a mais vantajosa para a bioconversão;
- ❖ otimizar as condições operacionais com o apoio de ferramentas de planejamento experimental, de tal modo a maximizar rendimentos e produtividade dos produtos de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinaria

O caminho da sociedade humana em busca de novo estilo de vida que englobe o ideal sustentável é irreversível e primordial. Esse movimento ocorre em todo mundo, também, por pressão da crescente escassez por reservas de combustíveis fósseis, da ampliação do aquecimento global e do crescente aumento nos custos e dificuldades nos processos de reciclagem, juntamente ao contínuo crescimento populacional e ao consumo de tecnologias e produtos que demandam mais e mais recursos naturais (OCTAVE & THOMAS, 2009).

A resposta para este cenário vem sendo encontrada dentro do contexto da biorrefinaria enquanto estrutura industrial que emprega biomassas agrícolas e agroindustriais como base para a produção de um vasto número de compostos químicos. Tal estrutura compreende as instalações e os processos através dos quais as matérias-primas renováveis e seus resíduos são transformados em biocombustíveis, produtos químicos com valor agregado, além de energia e alimentos (KAMM, GRUBER & KAMM, 2010).

Como nos diz de forma sucinta FitzPatrick *et al* (2010), o termo biorrefinaria elucida o próprio significado do nome que remete ao material utilizado (biomassa) e a natureza de conversão do mesmo, por meio de tecnologias diversas, muitas delas, híbridas, tais como química de polímeros e bioengenharia.

Dentro dessa nova planta industrial deve-se explorar toda e qualquer fração de biomassa, sejam moléculas em substituição aos derivados de petróleo, açúcares e óleos para produzir biocombustíveis, sejam lipídios para produção de larga gama de compostos como solventes, lubrificantes, surfactantes e outros. E, claro, caminhando sempre dentro daquilo proposto pela química verde em relação a processos mais limpos, economia de reagentes, reaproveitamento de resíduos e muito mais (OCTAVE & THOMAS, 2009).

A disponibilidade de matéria-prima para biorrefinarias, quando implementadas de acordo com logística correta, estrutura de apoio, conscientização dos

trabalhadores e dos produtores rurais, é realmente abundante, conforme nos diz Ferreira-Leitão *et al* (2010) ao relatar que o Brasil apresenta, entre as culturas de milho, trigo, cana-de-açúcar, arroz, mandioca, cítricos e algumas folhagens (grama, capim) uma produção anual de 597 milhões de toneladas de resíduos esperando destinação ou processamento corretos.

Por se utilizar de uma ampla variedade de matérias-primas, uma das mais marcantes características das biorrefinarias é sua flexibilidade em lidar com partículas de tamanho diversificado, com densidades variáveis, bem como com quantidades distintas de água dentro destes materiais. Como forma de organizar a indústria segundo o material que processa, as biorrefinarias podem ser classificadas como: biorrefinaria à base de carboidratos, biorrefinaria com base lignocelulósica e biorrefinaria com base lipídica (OCTAVE & THOMAS, 2009). A primeira propõe a utilização dos açúcares, que são as reservas de energia nos vegetais, ou seja, sacarose e amido que são mais acessíveis às necessidades energéticas dos vegetais e, atualmente, são amplamente utilizados pela indústria alimentícia. A segunda, baseia-se na utilização da fração estrutural do vegetal, e que assim, são de maior complexidade estrutural e apresentam dificuldade de aproveitamento da matéria-prima. A terceira utiliza-se das frações vegetais de oleaginosas diversas para obtenção de biocombustíveis, biodiesel e alguns compostos químicos específicos.

Há ainda outras abordagens, como aquela envolvendo engenharia genética sobre características desejadas de cada matéria-prima, sendo, então, bastante encontrada atualmente, e por tal abordagem apresenta enorme aplicabilidade em diversos setores industriais (KAMM, GRUBER & KAMM, 2010).

Fica claro como a bioconversão de materiais diversos (aqui, sobretudo, de caráter lignocelulósico como a CA) possui caráter promissor, o que a coloca em destaque como biomassa sustentável, renovável e que não concorre a nível alimentício (LIM & LEE, 2013). A lignocelulose é o maior componente estrutural de plantas, formando-se a partir da complexa combinação entre lignina, celulose e hemicelulose. O aproveitamento das três frações pode garantir a etapa final de viabilidade para essa biomassa que, dessa forma, torna-se mais atraente à produção de bioprodutos, de biocombustíveis e de energia (DAMARTZIS & ZABANIOTOU, 2011; DEMIRBAS, 2011).

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

O crescimento da demanda por combustíveis líquidos e insumos químicos tem levado ao desenvolvimento da segunda geração de tecnologias para o aproveitamento de biomassa, o que significa dizer que almeja-se o aproveitamento de materiais lignocelulósicos em resposta à (I) preço dos combustíveis e necessidade de formação de reservas energéticas pelas nações, (II) cuidado com o ambiente ao eliminar um resíduo poluidor, bem como a mitigação de reveses das atividades agrícolas e (III) implicações sociais e geográficas oriundas de novas plantas industriais que se usem desse material (FERREIRA-LEITÃO *et al*, 2010).

Há consenso entre a comunidade científica de que biomassas com essa característica são uma das mais importantes fontes renováveis para a produção de energia e de bioprodutos. Sobretudo considerando-se que, para ser usada para esse fim não são necessárias significativas alterações na estrutura e na logística das práticas agrícolas (SUXIA *et al*, 2012).

As células vegetais têm em suas paredes a fonte da lignocelulose a ser processada por essa nova tecnologia. Abordagens inovadoras estão sendo sistematicamente propostas por inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo que almejam de forma simplificada, romper a interação físico-química entre a celulose, hemicelulose e lignina (MENON & RAO, 2012). Primeiramente para produção de biodiesel, e também de bioetanol (Figura 1) e, igualmente, da quase infinita série de bioprodutos a serem obtidos desses materiais.

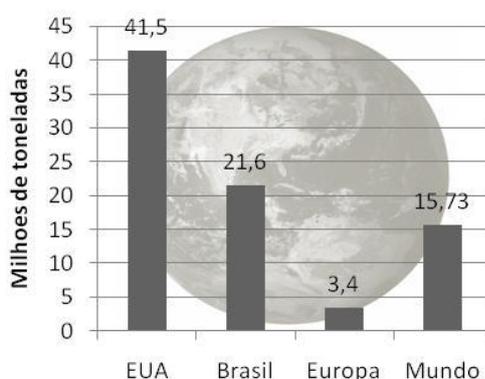


Figura 1 – Produção de bioetanol no mundo no ano de 2013.

Fonte: Adaptado de WebGargen (www.eniscuola.net).

De fato, os principais constituintes das biomassas lignocelulósicas são a celulose (~40-50%), um polímero de unidades β -D-glicopiranosose unidas por β (1 \rightarrow 4), a hemicelulose (~25-30%), um polímero formado por 5 diferentes sacarídeos dispostos em configuração amorfa, e lignina (~15-20%) que se caracteriza por ser um polifenol de arranjo irregular e amorfo, além de extrativos e materiais inorgânicos distintos (MENON & RAO, 2012, KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004). Devido à heterogeneidade destes materiais, tal composição varia de acordo com as propriedades particulares de cada vegetal, conforme mostra a Tabela 1.

A lignina, juntamente com a hemicelulose, forma uma matriz que envolve a celulose fazendo com que estes três componentes estejam estritamente associados em uma estrutura altamente complexa, dotada de regiões cristalinas (Figura 2). A celulose é empacotada em microfibrilas interligadas umas às outras pela hemicelulose por polímeros amorfos de diferentes açúcares, bem como por polímeros de pectina, sendo, finalmente, cobertos pela lignina. As microfibrilas celulósicas, que estão presentes na matriz hemicelulose-lignina estão associadas na forma de macrofibrilas. As moléculas individuais de microfibrilas estão empacotadas tão firmemente que, não somente enzimas, mas pequenas moléculas como a água, não conseguem penetrar no complexo (ARANTES & SADDLER, 2010; SANTOS *et al*, 2012).

Tabela 1 – Composição química aproximada de algumas biomassas.

Biomassa	Composição (% base seca)			Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Palha de cevada	34	36	19	Garda-Aparicio (2006); Rowel (1992)
Sabugo de Milho	32-45	40	7-14	Cao, Gong e Tsao (1997); Mckendry (2002)
Palha de Milho	35-39	21-25	11-19	Mosier <i>et al</i> (2005)
Haste de algodão	31	11	30	Schell, Ruth e Tucker (1999)
Palha de Arroz	29-35	23-26	17-19	Brylev <i>et al</i> (2001); Prasad, Singh e Joshi (2007)
Casca de Arroz	23-36	5-29	15-25	Ang <i>et al</i> (2012); Saha e Cotta (2008); Allen <i>et al</i> (2001); Abbas e Ansumali (2010)
Palha de Trigo	35-39	22-30	12-16	Prasad, Singh e Joshi (2007);
Bagasso Cana-de-açúcar	25-45	28-32	15-25	Alves <i>et al</i> (2010); Singh <i>et al</i> (2009)
Gramíneas	25-40	25-50	10-30	Howard <i>et al</i> (2003); Malherbe e Cloete (2002)
Palha de aveia	31-35	20-26	10-15	Rowell (1992)
Sisal	73	14	11	Gomez <i>et al</i> (2010)
Fibra de Côco	36-43	1	41-45	Gomez <i>et al</i> (2010)
Palha de sorgo	32-35	24-27	15-21	Herrera <i>et al</i> (2003); Vásquez <i>et al</i> (2007)

Fonte: Adaptado de OLOFSSON, BERTILSSON & LIDEN (2008); SANTOS *et al* (2012).

Dessa forma, fica evidente a necessidade de se obter uma separação efetiva de cada um destes constituintes durante o processamento, sendo esta etapa fundamental na composição de fatores de viabilidade econômica dos múltiplos produtos gerados (MENON & RAO, 2012).

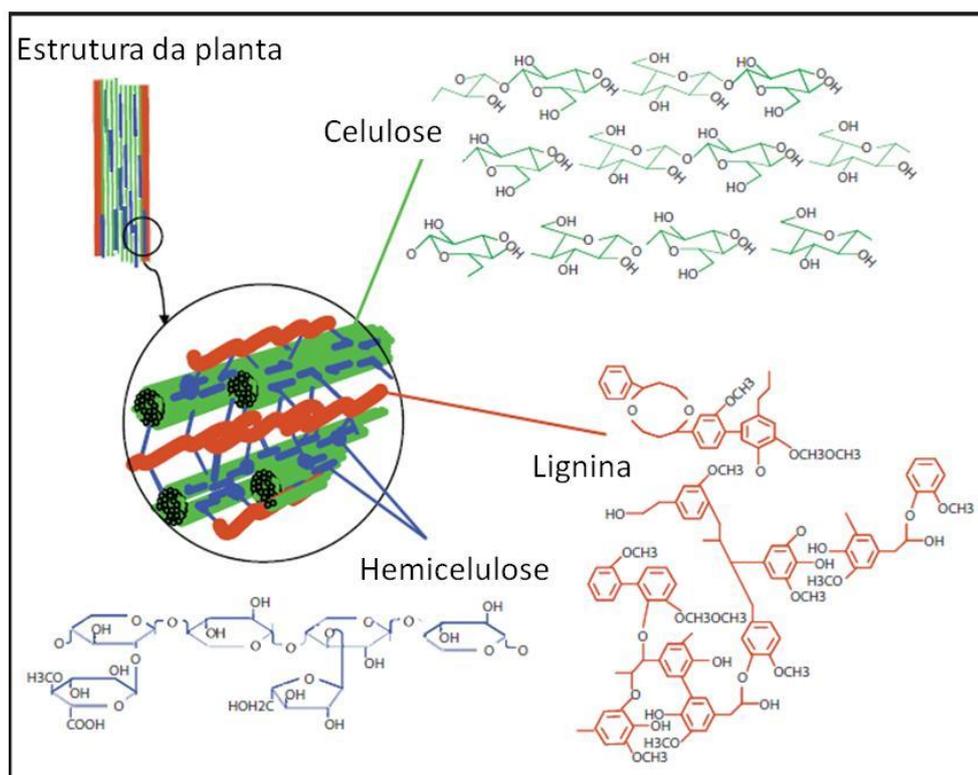


Figura 2 – Estrutura lignocelulósica recalcitrante contendo celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: Adaptado de WebGargen (www.biofuel.webgarden.com).

As biomassas de segunda geração são produzidas, principalmente, por duas rotas distintas: a termoquímica (emprego de pirólise, gasificação e similares) e a bioquímica (emprego de enzimas e processos fermentativos) (DAMARTZIS & ZABANIOTOU, 2011).

Tipicamente, a estrutura recalcitrante da lignocelulose é atacada sofrendo hidrólise que, por sua vez, redistribui esse substrato e permite uma maior acessibilidade (aumento da área de contato, e possibilidade de solubilização) da celulose e hemicelulose em geral, segregando a lignina do meio (FITZPATRICK *et al*, 2010).

A hidrólise total da celulose gera apenas glicose, que é considerada a principal matéria-prima para processos biotecnológicos, podendo ser convertida em diversos produtos, tais como etanol (SILVA *et al*, 2012), lipídeos, 5-hidroximetil-furfural (5-HMF) (BEVILAQUA, 2013), furfural (BEVILAQUA, 2010), ácidos orgânicos (MONTIPÓ, 2012), glicerol, sorbitol, manitol, frutose, enzimas, dentre outras (KAMM, GRUBER & KAMM, 2010). Por outro lado, a hidrólise da fração hemicelulósica produz uma verdadeira mistura de açúcares, predominando, no caso da CA, a xilose, que pode ser convertida a xilitol (RAMBO *et al*, 2013) e outros. Quando não é queimada para gerar energia, a maior parte da lignina remanescente do processo hidrolítico oferece perspectivas de utilização para a obtenção de produtos com valor agregado. Recentemente, pesquisas têm demonstrado que a lignina possui um potencial que vai muito além do que lhe foi atribuído até o momento – geração de energia através de sua queima. Muitos exemplos de aplicações são possíveis hoje, ensejando esforços de pesquisa recentes em todo o mundo, mas destaca-se a produção de dispersante para a indústria química, aditivo/substituto de resinas fenólicas para produção de painéis, na produção de fibra de carbono, como veículo de fertilizantes e pesticidas, fonte de compostos químicos distintos, etc (DOHERTY, MOUSAVIOUN & FELLOWS, 2011; ZHANG, 2008).

A planta de uma biorrefinaria lignocelulósica, por conclusão, não pode abrir mão de nenhuma fração da biomassa adotada. Este objetivo só é atingido com uma abordagem sinérgica entre inúmeros processos, onde todos os açúcares isolados da lignocelulose são efetivamente convertidos em bioprodutos, biopolímeros e biocombustíveis, e onde a fração de resíduos gerada não se perde, mas é utilizada na geração de energia na própria planta ou em associações industriais próximas (FITZPATRICK *et al*, 2010)(Figura 3).

Segundo Menon & Rao (2012), na biorrefinaria lignocelulósica, a conversão da biomassa geralmente envolve cinco etapas: I) definição da biomassa a ser processada; II) análise de pré-tratamento eficiente; III) escolha por hidrólises ácida e/ou enzimática; IV) etapa fermentativa a partir das hexoses (glicose, galactose, manose e frutose) e pentoses (xilose e arabinose) e V) recuperação e purificação dos produtos obtidos. Contudo, as principais dificuldades que residem no desenvolvimento de uma tecnologia economicamente viável para a biodegradação da celulose são, uma vez mais, a intrínseca associação com a hemicelulose e com a lignina, a cristalinidade da estrutura, o grau de polimerização e a área superficial.

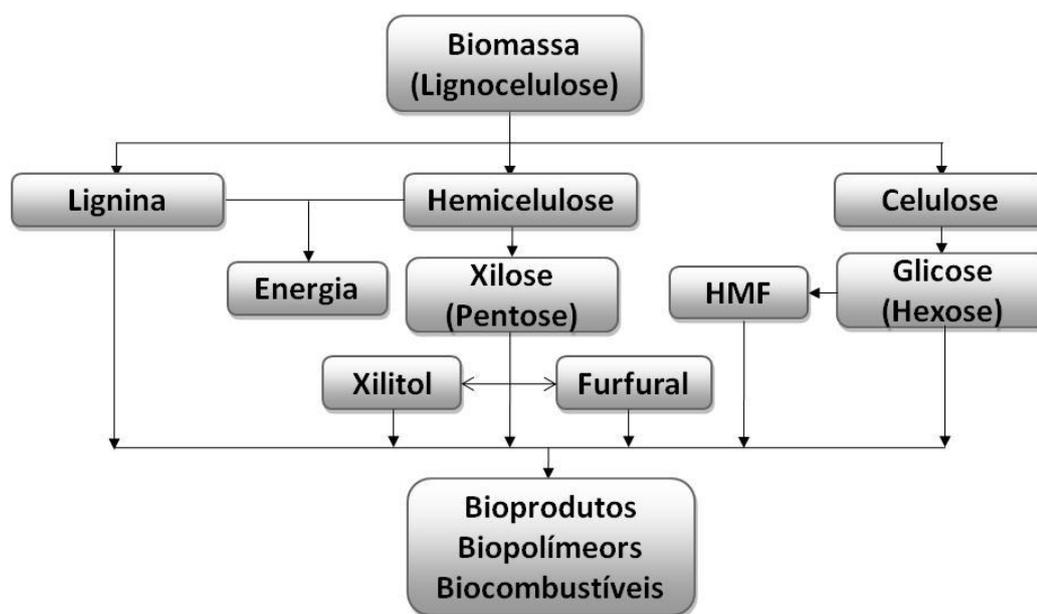


Figura 3 – Estrutura simplificada para biorrefinaria com base em biomassa de composição lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de Kamm, Gruber & Kamm (2010)

Apesar da carência, no Brasil, por maiores esforços em pesquisa e aplicação das recentes descobertas sobre biomassas, que poderiam incluir inúmeras séries de resíduos agrícolas ao longo de nosso vasto território, alguns grupos vêm se destacando nas propostas e publicações na área (Figura 4). Nota-se claramente a ausência de grupos de trabalho nas regiões centro-oeste e norte de nosso país, áreas essas onde há imensa diversidade de possíveis matérias-primas, com abundância de oferta, e que apenas por esses motivos justificariam esforços de pesquisa.

Espera-se que haja um aumento significativo nas pesquisas e nos investimentos, e que os frutos desses esforços sejam recebidos de forma rápida e significativa por toda a sociedade. A progressiva postergação na troca das fontes não-renováveis por outras oriundas de processos renováveis, apenas adia o progresso científico nessa área. Os interesses da sociedade não devem ser relegados a um segundo plano em prol de interesses de grandes multinacionais ligados ao setor petrolífero, em relação à manutenção da atual estrutura energética mundial.



Figura 4 – Grupos de pesquisa brasileiros pesquisando o aproveitamento de materiais lignocelulósicos.

2.1.1.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

A estrutura lignocelulósica descrita neste trabalho, que é característica geral das biomassas de segunda geração, apresenta o desafio de uma inevitável etapa de pré-tratamento capaz de romper o complexo lignocelulósico. Sem esta operação unitária, a digestibilidade da celulose e da hemicelulose fica comprometida, o que por sua vez, inviabiliza o próprio uso da biomassa como matéria-prima (Figura 5).

A importância desta etapa do processo justifica a crescente pesquisa e o número de publicações que tratam especificamente deste item da marcha analítica, bem como justifica as inúmeras propostas atuais, todas dotadas de prós e contras, sem ainda uma metodologia unânime (Menon & Rao, 2012).

Em linhas gerais, alguns cuidados devem ser tomados na escolha da abordagem a ser adotada, visando a viabilidade técnica e econômica, sendo elas: facilitar a posterior ação da etapa hidrolítica (seja ela ácida ou enzimática) ao expor as fibras celulósicas; evitar condições extremas de operação que possam acarretar na degradação dos açúcares presentes e na formação de altas concentrações de inibidores aos micro-organismos fermentativos; possuir baixo custo de construção, de operação e de manutenção; gerar o mínimo possível de resíduos, bem como de etapas unitárias (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

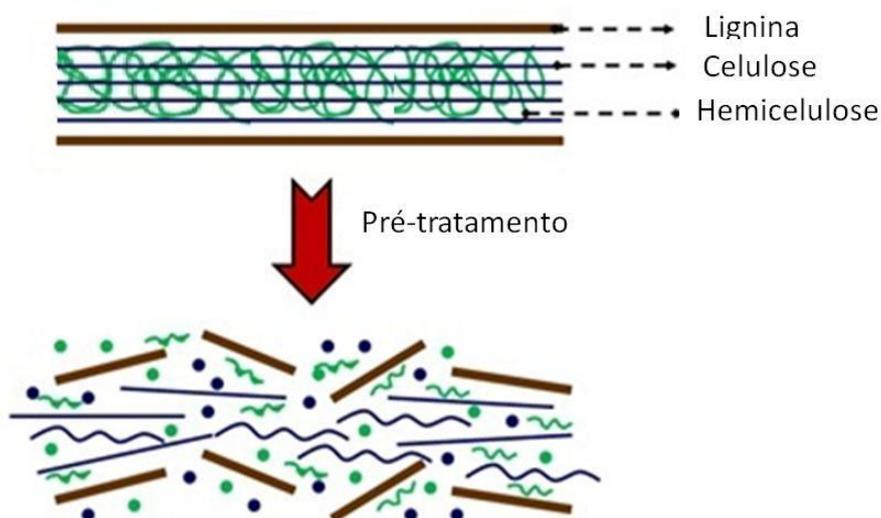


Figura 5 – Pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas.

Fonte: Adaptado de Doherty *et al.* (2010).

Segundo sua ação sobre a biomassa, o pré-tratamento é classificado em físico, físico-químico, químico ou ainda biológico. No entanto, o usual é o emprego de múltiplos agentes, explorando-se o sinergismo das ações, que podem ser: temperatura, pH, tempo de processo, agitação e outros (KESHWANI & CHENG, 2009).

Os pré-tratamentos físicos costumam envolver moagem, extrusão e até irradiação (micro-ondas e ultrassom) (MENON & RAO, 2012; ROOS *et al*, 2009), porém, os melhores resultados empregando estas abordagens costumam vir de combinações com agentes ácidos (CHOI, UM & OH, 2012). Sua eficácia é explicada pela quebra da cristalinidade da biomassa, porém, as dificuldades na transferência de massa e calor são graves limitantes. O que não impede, claro, a obtenção de bons resultados com biomassas específicas sob condições otimizadas (SILVA *et al*, 2012).

Os mais importantes pré-tratamentos físico-químicos incluem explosão a vapor (catalisada ou não por CO₂) (do inglês, *steam explosion*), explosão de fibras com amônia (AFEX) e água líquida quente (LHW) (TAHERZADEH & KARIMI, 2008; YU *et al*, 2013b). Dentre as categorias de pré-tratamentos existentes, a classe dos químicos tem sido estudada extensivamente e inclui, em geral, tratamentos ácidos e

alcalinos (YU *et al*, 2013), além da utilização de solventes orgânicos (ZHANG *et al*, 2012), líquidos iônicos (BRANDT *et al*, 2013), peróxidos e ozônio (YU *et al*, 2013).

Ambas as abordagens, físico-química ou química apenas, apresentam vantagens e desvantagens, que devem obrigatoriamente ser consideradas antes de sua utilização. Como exemplo cita-se o custo de sistemas de explosão a vapor, ou mesmo de alguns solventes como líquidos iônicos, que chegam a valores proibitivos quando se pensa em aumento de escala de processo (YU *et al*, 2013), ou ainda, a alta toxicidade final da biomassa que demanda etapas extras de destoxificação (LUCAS *et al*, 2012).

Notadamente, a hidrólise ácida diluída em temperaturas intermediárias é a técnica mais usual dentre as abordagens aqui discutidas, visto sua positiva relação de custo-benefício (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). Pode servir tanto como um tratamento da lignocelulose para a posterior hidrólise enzimática, quanto como um método de hidrólise propriamente dito para fermentar açúcares. Isso se explica pois ela é eficiente na remoção da hemicelulose e celulose (conversão entre 80-90% em açúcares), mas não tanto da lignina (RUÍZ *et al*, 2013; MENON & RAO, 2012; VASCONCELOS *et al*, 2013).

Ademais sobre a hidrólise ácida, suas três maiores vantagens residem na dispensa por equipamentos mais sofisticados (desde que não envolva processos sob pressões elevadas), possui boa relação de custo-benefício, produz pouco resíduo e baixo consumo de reagentes (HEREDÍA-OLEA, PÉREZ-CARRILLO & SERNA-SALDÍVAR, 2012).

A hidrólise envolve, basicamente, a adição de ácido diluído (H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 , HNO_3 , etc.) (YU *et al*, 2013; LENIHAN *et al*, 2010; VASCONCELOS *et al* 2013), normalmente em proporções diluídas de até 7% ($v v^{-1}$) e hidrolisa a biomassa a temperaturas de 130-210 °C por minutos ou horas (KESHWANI & CHENG, 2009). Sob tais condições, subprodutos distintos são formados a partir da degradação dos açúcares e da lignina (FERRER *et al*, 2013). Estes compostos integram, basicamente, três grupos principais: derivados de furanos (5-HMF e furfural a partir da degradação de hexoses e pentoses, respectivamente); ácidos orgânicos (principalmente acético, fórmico e levulínico), formados a partir da degradação de furanos; e compostos fenólicos como vanilina, 4-hidroxibenzaldeído e fenol, gerados pela degradação parcial da lignina (KAMM, GRUBER & KAMM, 2010; ALMEIDA *et al*, 2007). Tais produtos secundários afetam negativamente a fermentação devido à

ação tóxica aos micro-organismos fermentativos (MUSSATTO & ROBERTO, 2004; LIM & LEE, 2013), e sua produção depende diretamente da ação sinérgica entre as variáveis de operação e suas alterações sobre a estrutura da biomassa.

O emprego de abordagens envolvendo micro-organismos é viável e se respalda no seu caráter sustentável, ausência de reagentes químicos e condições energéticas significativas (SALVACHÚA *et al.*, 2011; KURAKAKE, IDE & KOMAKI, 2007). Porém, necessita ainda de pesquisas e avanços na superação de reveses como o elevado tempo de processo, a elevada necessidade de controle do crescimento microbiano, bem como posteriores necessidades de separação do sistema final (MENON & RAO, 2012).

2.1.1.2 Casca de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) está entre os cereais mais consumidos do mundo, conforme a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2013). A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) posicionou o Brasil como nono maior produtor mundial, com previsão de colher 11,9 milhões t na safra 2012/2013, o que representa um acréscimo de 2,2% sobre as 11,6 milhões t da safra 2011/2012. São mais de 2,4 milhões de hectares de arroz cultivados em todo o Brasil (Tabela 2). O Rio Grande do Sul contribui com cerca de 66,4% da produção nacional, sendo assim o maior produtor brasileiro, com avanço de 2,5% em relação à safra passada. Santa Catarina e Maranhão são, respectivamente, o segundo e terceiro maiores produtores (CONAB, 2014).

Após o processo de beneficiamento, a CA (cerca de 20% do grão), composta de 41% de carbono, 36% de oxigênio e 18% de cinzas (base seca) (CORTEZ, LORA & GÓMEZ, 2011), torna-se um rejeito agrícola, caracterizado pela natureza abrasiva, baixa densidade, elevado conteúdo de cinza/sílica, baixa biodegradabilidade e difícil digestibilidade (Figura 6) (SAHA & COTTA, 2008), sendo que estas particularidades fazem da CA um subproduto com pouco valor nutritivo e nulo valor comercial.

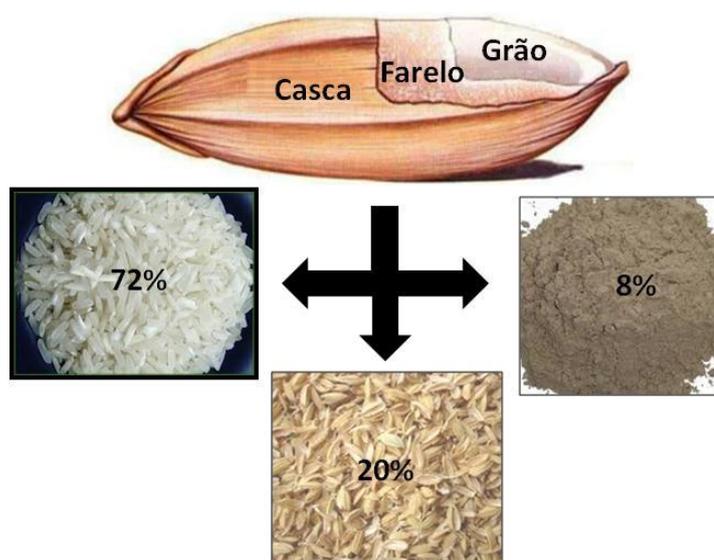


Figura 6 – Constituição do arroz, sendo casca (20%), farelo (8%) e grão (72%).

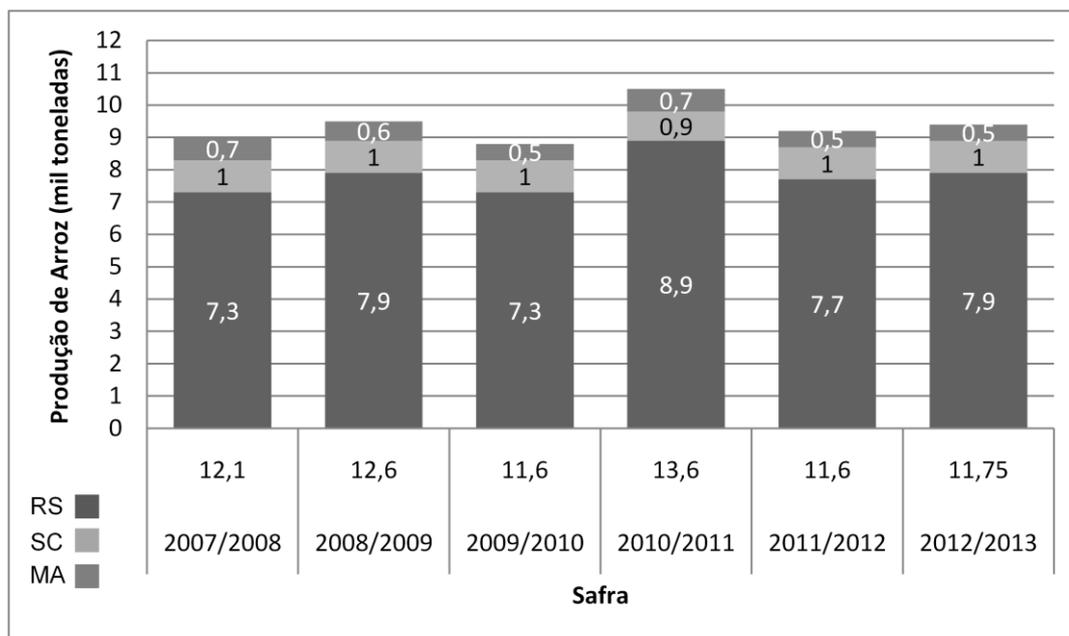
Fonte: Embrapa, 2013

Adicionalmente, a CA é comumente eliminada através da queima em campos abertos (com raras exceções de queima para geração de energia), visto que a logística de transporte para descarte adequado é economicamente desfavorável, o que desencadeia problemas ambientais e de saúde pública, bem como, desperdício de energia (LIM & LEE, 2013). Publicações de recentes pesquisas relatam a incorporação de CA em materiais cimentícios (ZAIM *et al.*, 2011), adsorbente na purificação de biodiesel (MANIQUE *et al.*, 2012), blocos de construção civil (SUTAS, MANA & PITAK, 2012), síntese de zeólitas e produção de diferentes tipos de silicatos (FOLETTTO *et al.*, 2005) e até na incorporação de alimentação animal após processos de suplementação (VADIVELLOO, NURFARIZA & FADEL, 2009).

A dificuldade na destinação da CA independe do beneficiamento a que o arroz é submetido, sendo ele parboilizado ou não, e igualmente sofre pouca alteração de acordo com as particularidades do grão (por exemplo: grão polido, arbóreo, malequizado) (Embrapa, 2013). A parboilização da CA (essa sendo equivalente a 20% de todo o volume produzido no beneficiamento) consiste em processo hidrotérmico onde a CA é imersa em água (>58 °C), seguida de gelatinização parcial ou total do amido e finalizando com etapa de secagem. Esse

procedimento esse eleva significativamente seu valor nutritivo (Embrapa, 2013; FAO, 2013).

Tabela 2 – Produção de arroz dos maiores estados produtores brasileiros.



Fonte: CONAB, 2014.

A conversão da CA, bem como da palha do arroz, em produtos com valor agregado pode servir a múltiplos propósitos positivos, como o aumento da viabilidade econômica da cultura e redução da poluição ambiental (seja pelo descarte no meio ambiente como pela queima incorreta) (HOSSEINI & AZIZ, 2013).

Assim como as demais biomassas lignocelulósicas, a CA necessita ter sua estrutura desorganizada, rompendo a cristalinidade da matriz e, então, ampliando as regiões amorfas mais suscetíveis aos posteriores processos de conversão em bioprodutos (SANCHEZ & CARDONA, 2008).

A CA é um dos resíduos lignocelulósicos que tem atraído a atenção dos pesquisadores devido ao seu conteúdo de celulose e hemicelulose (28-65%) e ao seu potencial para produção de bioprodutos e (de) biocombustíveis (ANG *et al*, 2012). Tentativas de emprego de CA como combustível para gasificação e até combustão em reatores com leito fluidizado não obtiveram resultados satisfatórios,

visto que a CA é de difícil aproveitamento da fração de carbono presente no elevado teor de cinzas (JOHAR, AHMAD & DUFRESNE, 2012).

Devido ao teor energético da CA, a pirólise tem sido proposta como processo de valorização deste resíduo (LIM *et al.*, 2012). A cinza da CA, resultante da queima, é rica em sílica (SiO_2), deste fato advém a proposta de incorporação da mesma em diferentes materiais na área de construção civil (CARLOS & KHANG, 2008). Em comparação a outras variedades de biomassas, o poder calorífico superior da CA fica em $16,14 \text{ MJ kg}^{-1}$, valor que se compara a parâmetros de materiais como pinus ($20,02 \text{ MJ/kg}$) e eucalipto ($19,42 \text{ MJ/kg}$) (CORTÉZ, LORA & GÓMEZ, 2011).

Inúmeros trabalhos sobre a utilização da CA estão disponíveis na literatura, visando a produção de: furfural (SUXIA *et al.*, 2012), etanol (CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011; MEGAWATI *et al.*, 2010; BINOD *et al.*, 2010), ácido levulínico e 5-HMF (BEVILAQUA, 2013), xilitol (RAMBO *et al.*, 2013) e ácido láctico (MONTIPÓ, 2012), via hidrólise ácida diluída; furfural por catalisador ácido sólido (SUXIA *et al.*, 2012); etanol por pré-tratamento com Ca(OH)_2 e sacarificação enzimática (SAHA & COTTA, 2008); e, ademais, diversos compostos produzidos por pré-tratamento com ácido diluído seguido de hidrólise ácida concentrada ou alcalina (MA *et al.*, 2011), pré-tratamento líquido iônico (ANG *et al.*, 2012) e pirólise (MARTINS *et al.*, 2007; JI-LU, 2007).

2.2 Ácido Itacônico

Situado entre os mais importantes produtos biotecnológicos se encontram os ácidos orgânicos por serem compostos versáteis precursores de diversos bioprodutos e materiais para sínteses industriais (KLEMENT & BÜCHS, 2013). Há exatamente uma década, no ano de 2004, foram definidos pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos os 14 principais biocompostos em que se baseia a plataforma biotecnológica (Figura 7), onde fica evidenciada a importâncias de tais ácidos para a sociedade e a indústria deste século (RODRIGUES, 2011).

O ácido itacônico, ou ácido metilenosuccínico, é um ácido orgânico dicarboxílico saturado, cuja fórmula molecular é $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$, possuindo massa molar de

130,1 g mol⁻¹. Este composto foi descoberto por Baup, em 1936, como um produto da destilação do ácido cítrico (KLEMENT & BÜCHS, 2013).

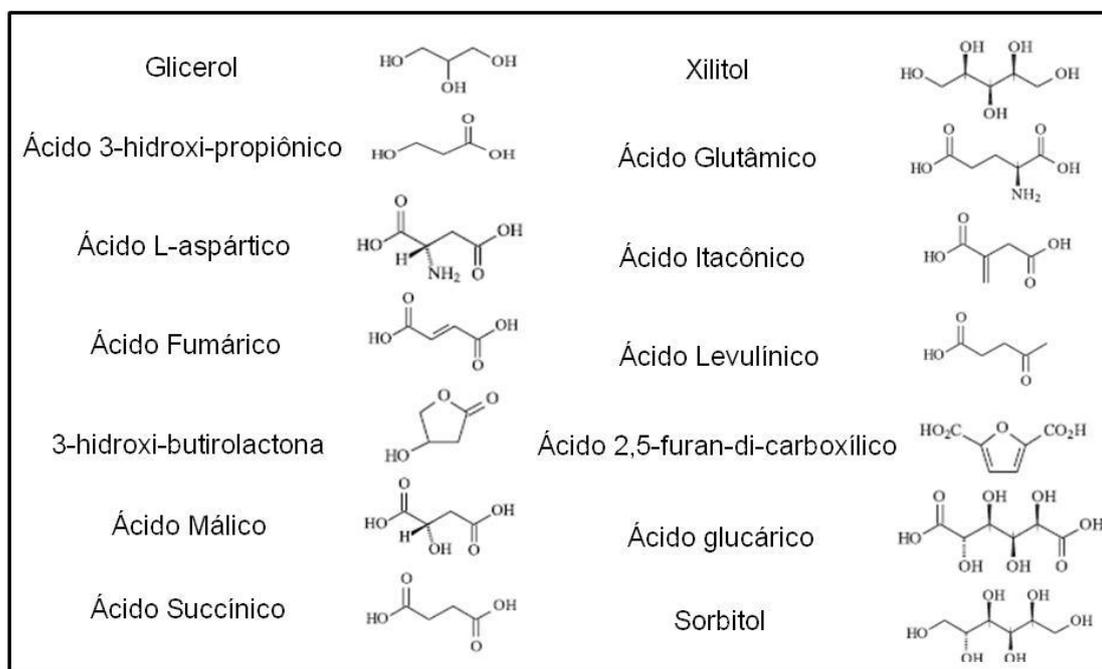


Figura 7 – Lista dos compostos usados como plataformas de biomassa.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES, 2011.

Por sua crescente importância e aplicabilidade industrial, estudos de solubilidade do AI em diversos sistemas (solventes e matrizes) têm sido publicados e ganho destaque por sua valia industrial (YANG *et al*, 2012), bem como a possibilidade de polimerização a ácido poli-itacônico (API) e co-monômero em diversos compostos poliméricos como acrilamida, são ainda mais saudados como novas rotas a serem exploradas (WILKE & VORLOP, 2001; KRUSIC *et al*, 2004).

O AI pode ainda ser usado como substituto do ácido metacrílico na indústria petroquímica (LEE *et al*, 2011). Ainda tem aplicações como aglutinante em diversos plásticos, colas, tintas, lubrificantes e revestimentos. Pode ser empregado, também, como princípio em drogas antifúngicas, em terapias de pele, na confecção de lentes de contato e filtros dentais (FERREIRA, ROCHA & SILVA, 2009; OKABE *et al*, 2009). Adicionalmente, o AI serve de precursor na síntese de diversos compostos de

variada aplicação industrial (Figura 8), compostos esses que tiveram suas rotas sintéticas favorecidas pelo incremento na produção e interesse pelo AI (GENÉTIKA, 2014).

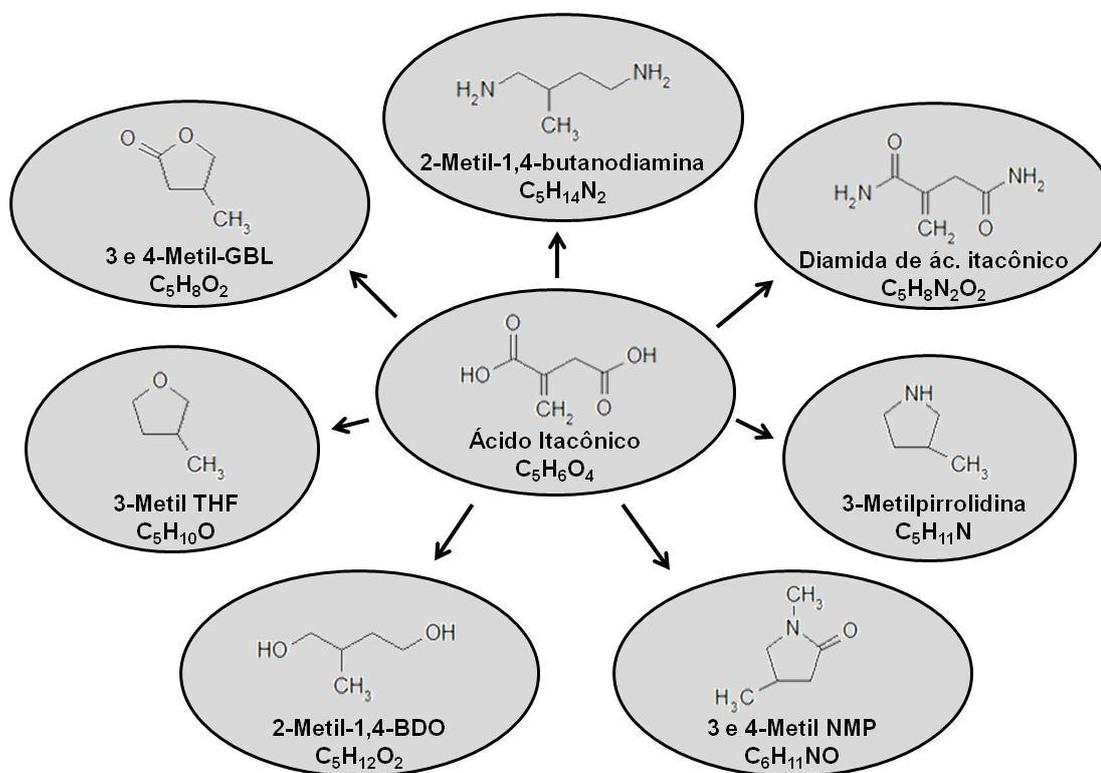


Figura 8 – Lista dos compostos produzidos a partir do AI.

Fonte: Adaptado de GENETIKA (2014).

As rotas químicas para produção do AI empregadas em maior escala são a partir da pirólise do ácido cítrico, que resulta na perda de água e conversão a aconitato, com subsequente descarboxilação levando ao ácido itacônico e o isômero ácido citracônico e, ainda, via condensação catalítica de derivados do ácido succínico em presença de formaldeído, em escala laboratorial onde há a formação do intermediário ácido citracônico (SHEKHAWAT, JACKSON & MILLER, 2006), Contudo, comercialmente ele é obtido pela produção biotecnológica a partir do fungo *Aspergillus terreus*, apesar de outros organismos serem reportados (Tabela 3) com algumas abordagens empregando fluxo contínuo de produção e recuperação (CARSTENSEN *et al*, 2013)

A primeira produção de AI que se tem conhecimento ocorreu em 1955, na empresa Pfizer Co. Inc. (EUA) através de fermentação submersa. Esta metodologia foi seguida por outras na Inglaterra, França, Rússia e Japão (OKABE *et al*, 2009). A produção de AI atinge algo em torno de 80 mil t ano⁻¹, somando-se os processos contínuos e em batelada, com valor médio de comercialização de US\$ 400 milhões até o fim desta década, apesar da crescente produção chinesa que acaba reduzindo o valor comercial do AI (KLEMENT & BÜCHS, 2013). Mesmo que em passado recente a procura pelo produto era menor que a capacidade produtiva, em consequência das reduzidas aplicações conhecidas anteriormente, hoje já se estabeleceu uma posição comercial positiva para o AI (OKABE *et al*, 2009).

Tabela 3 – Micro-organismos produtores de AI.

Micro-organismo	Concentração de AI (g L ⁻¹)	Referência
<i>Aspergillus terreus</i> (estágios iniciais-1945)	24-27	Klement & Büchs, 2013
<i>Aspergillus terreus</i> (processo otimizado)	± 86	Klement & Büchs, 2013
<i>Ustilago maydis</i>	53	Klement & Büchs, 2013
<i>Candida spp.</i>	35	Tabuchi & Nakahara, 1980
<i>Rhodotorula spp.</i>	15	Okabe <i>et al</i> , 2009
<i>Pseudozoma antartica</i>	30	Levinson, Kurtzman & Kuo, 2006

2.3 Fermentação fúngica

2.3.1 Micro-organismos produtores de ácido itacônico

Os primeiros produtores de AI, no gênero *Aspergillus*, foram identificados como *A. itaconicus* na década de 1930, sendo, então, substituídos pela descoberta do *A. terreus* (na década de 1990), capaz de produzir AI em condições limitadas de fosfatos no meio. Com o advento de estudos de engenharia genética, visou-se identificar os mecanismos metabólicos que o levam a ter esta capacidade produtiva

única de sintetizar AI (KLEMENT & BÜCHS, 2013; LI *et al*, 2011), isto é, verdade para todos os fungos filamentosos que hoje são encarados como micro-organismos fundamentais nas pesquisas biotecnológicas, sendo que técnicas de modificação de RNA e DNA são alvo de intensos estudos que vem gerando crescente resultado técnico-científico (MEYER, 2008).

Os fungos possuem importância ímpar no meio ambiente por sua ação decompositora, função essa tão importante à continuidade da vida quanto aquela dada aos organismos produtores. Existem mais de 70 mil espécies de fungos identificados, e cerca de 1,7 mil espécies são descobertas a cada ano (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2007).

O fungo *Aspergillus terreus* é hoje aquele que recebeu maior ênfase da pesquisa visando compreensão da produção de AI. Apesar de não ser totalmente compreendida ainda a rota produtiva do AI, estudos recentes comprovaram que o ciclo do ácido cítrico (ou ciclo do ácido tricarboxílico) é responsável pela produção do cis-Aconitase que evade da mitocôndria e sofre ação da cis-aconitase descarboxilase (CAD) que produz o composto intermediário itaconato, que uma vez liberado da célula é convertido em AI.

As moléculas de glicose utilizadas como fonte para produção de piruvato (etapa da glicólise) que entram no ciclo do ácido cítrico são degradadas (KERBAUY, 2008; TEVZ, BENCINA & LEGISA, 2010). Alguns estudos citados por Klement & Büchs (2013) afirmam que a glicose é utilizada principalmente pela rota Embden-Meyerhof e não necessariamente pela via do piruvato (Figura 9) (KLEMENT & BÜCHS, 2013; RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2007).

A comprovação da rota descrita acima foi encontrada por Dwiarti *et al* (2002) que isolou e caracterizou a enzima CAD, e por Kanamasa *et al* (2008) que, tendo isolado o gene específico da CAD, transformou o referido gene de um fungo *Saccharomyces cerevisiae* tornando-o produtor de AI. Estudos posteriores a esses, estão investigando a região ao redor do gene em busca de maior compreensão de sua ação. Esta etapa já resultou em avanços, como a compreensão de que próximo ao referido gene encontra-se outro gene responsável pela produção de lovastatina, também produzida pelo *A. terreus* de forma paralela ao AI (LI *et al*, 2011).

Outros organismos utilizados para produção de AI podem ser citados, como exemplo o fungo *Ustilago maydis*, que em condições ideais de fermentação (conseguindo-se cessar seu crescimento em prol da produção de AI) pode-se obter

consideráveis frações de AI. Estudos com variáveis mutantes de *U. maydis* necessitam ainda de tempo e pesquisa, mas são promissores (PANAKOVA *et al*, 2009).

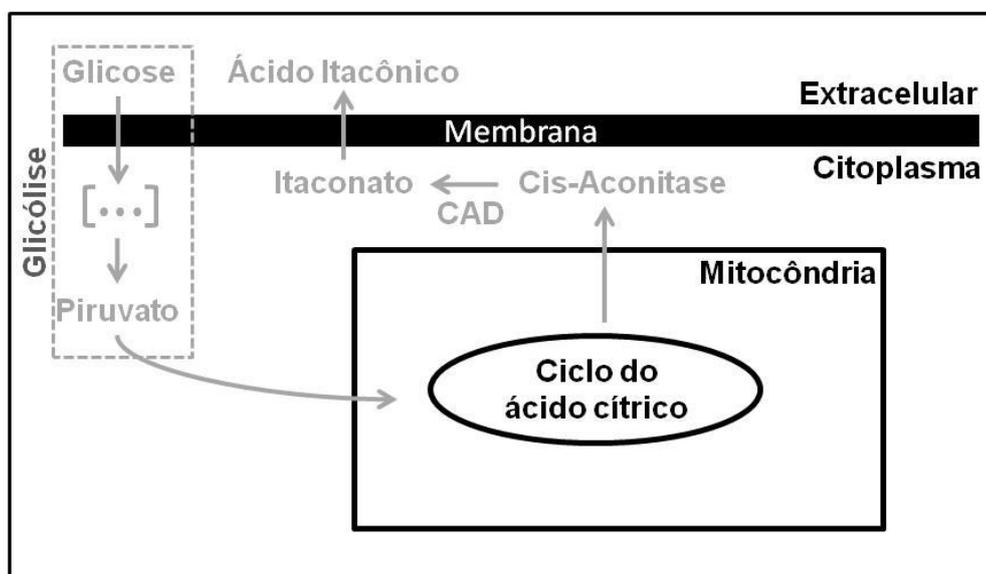


Figura 9 – Rota biosintética do AI evidenciando pontos-chave

Fonte: Adaptado de Klement & Büchs, 2013.

Buscando outros micro-organismos produtores de AI, Levinson, Kurtzman & Kuo (2006) propuseram o emprego do fungo *Pseudozyma antarctica* em condições limitadas de nitrogênio como alternativa viável, citando que não há grandes dificuldades em trabalhar com este fungo em biorreatores, enquanto *A. terreus* possui algumas particularidades (por exemplo, sensibilidade à presença de metais) que dificultam seu emprego.

Algumas tentativas resultaram em produções inferiores e acabaram não merecendo maior destaque e atenção, como o caso do fungo do gênero *Rhodotorula*, que não atingiu sequer 15 g L^{-1} de concentração de AI (KAWAMURA *et al*, 1981) ou do gênero fúngico *Candida* que produziu 35 g L^{-1} em variante não-mutagênica, enquanto trabalhos envolvendo melhoria genética obtiveram aumento restrito (em comparação aos resultados de outros procedimentos de engenharia genética), atingindo-se apenas 42 g L^{-1} (TABUSHI & NAKAHARA, 1980).

2.3.2 Modos de fermentação

A formação de AI, por *A. terreus* é estritamente um processo aeróbico, onde 1,5 mol de O₂ é consumido para cada mol produzido de AI a partir de glicose. Essa constante aeração do sistema costuma ser feita por agitação mecânica, o que necessita energia, reatores com alguma complexidade tecnológica e que pode, visto que *A. terreus* é um fungo filamentosos (possuir o micélio sensível a choques mecânicos) gerar um *stress* negativo ao fungo. Esse fato levou a propostas de reatores (ou sistemas) com adição de ar rico em oxigênio (em sistema submerso) como os reatores sustentados com ar (do inglês, *air lift bioreactor*) (KLEMENT & BÜCHS, 2013; JUY, OREJAS & LUCCA, 2010).

O pH tem fator decisivo nessa fermentação visto que influi inclusive na resistência de *A. terreus* ao efeito mecânico da agitação, sendo que valores menores de pH tornam o micélio do fungo mais vulnerável (RISCALDATI *et al*, 2000). Por outro lado, em valores de pH acima de 3,0, a transferência de oxigênio é facilitada assim como diminui-se a formação de co-produtos, assim como a faixa de pH entre 4,0-6,0 permite condições menos estéreis de crescimento fúngico (RISCALDATI *et al*, 2000; JUY, OREJAS & LUCCA, 2010).

O fungo aqui descrito tem capacidade moderada de hidrolisar substratos lignocelulósicos através do uso de exo-enzimas que ele produz o que torna desnecessária (e até não recomendável) condições extremas de hidrólise feitas na biomassa antes da etapa fermentativa (KLEMENT & BÜCHS, 2013). Ademais, *A. terreus* é capaz de utilizar como fonte de energia, glicose, xilose, e açúcares como sacarose e lactose, e até mesmo glicerol já foi reportado como passível de uso (JUY, OREJAS & LUCCA, 2010).

Muitos parâmetros precisam ser previstos e otimizados em busca de rendimentos satisfatórios, como nos diz Lakshmi *et al* (2009), afirmando que itens como temperatura de incubação, tempo de incubação, composição do meio, pH inicial, tamanho da partícula de biomassa, concentração do inóculo, concentração de açúcares e outros particulares de cada micro-organismo.

Processos contínuos são possíveis, mas exigem uma cuidadosa etapa de otimização das condições de processo a fim de atingir melhores produtividades, seja

pelo posterior processo de *downstream* (em geral filtração, vaporização ou cristalização) (ZHANG, MA & LEE, 2009), bem como seja pela necessidade de manter condições limitadas de nutrientes a fim de garantir crescimento fúngico sem comprometer a produção de AI (KLEMENT & BÜCHS, 2013; JUY, OREJAS & LUCCA, 2010). Os melhores desempenhos reportados são com a utilização de células imobilizadas (em polímeros como géis de ágar, poliacrilamida e poliuretano), relatando-se concentrações de 26 g L^{-1} , valor este inferior aos trabalhos em batelada. Se considerada, ainda, a dificuldade em ampliar a escala, percebe-se a necessidade por mais P&D nesta área (WELTER, 2000).

2.4 Emprego de Ferramentas Estatísticas

Diante no número de variáveis envolvidas no processo de hidrólise da biomassa (temperatura, tempo, pressão, concentração ácida, natureza do ácido, tamanho da partícula de biomassa) e nos processos fermentativos (concentração do inóculo, pH inicial, temperatura e tempo de processo, concentração de açúcares e interferentes, volume do sistema e adição de nutrientes), é indispensável o uso de ferramentas estatísticas capazes de fornecer dados confiáveis sem que haja uma demanda excessiva por experimentos, consumo de tempo e reagentes (BEZERRA *et al*, 2008; YOO, LEE & KIM, 2011). Nesse contexto, o emprego de abordagens multivariadas é encorajada como metodologia que permite atingir um patamar otimizado de resultados com melhor relação custo benefício (CHANG, XU & JIANG, 2012).

Existem diversas ferramentas de análise multivariada de experimentos, tais como a metodologia por superfície de resposta (do inglês, *Response Surface Methodology – RSM*) (YOO, LEE & KIM, 2011), Tagushi Design (CHEN, CHEN & HUNG, 2013), Design Composto Rotacional Central (do inglês, *Central Composite Rotational Design – DCCR*) (BEZERRA *et al*, 2008), Box-Behnken (FERREIRA *et al*, 2007) e outros. De forma geral, o que se almeja é a construção de um modelo estatístico empírico que preveja os efeitos atuantes sobre um processo, de forma que não só sua ação direta esteja em consideração como também o efeito das interações entre múltiplas variáveis. Enquadrar um sistema teórico ao

comportamento real de um sistema leva, por sua vez, à melhor compreensão do mesmo (CHANG, XU & JIANG, 2012).

Abordagens univariadas, por outro lado, não consideram o efeito (muitas vezes de maior relevância) das interações entre as variáveis de um processo, além de consumir maior tempo, reagente e esforço aplicado no estudo. Resultando ainda em dados sem a garantia de ter-se alcançado a região otimizada de um sistema (LOPES, *et al*, 2009).

Em particular com o emprego de RSM, visa-se a superfície de uma equação polinomial (resultado de técnicas estatísticas e matemáticas) que expresse o resultado experimental, possibilitando estabelecer previsões acerca do sistema em estudo (BEZERRA *et al*, 2008). Não apenas para esse caso, mas como procedimento padrão em estudos de processos com muitas variáveis envolvidas, encoraja-se a execução de estudos prévios que permitam estabelecer parâmetros desconsideráveis e aqueles que são fundamentais (LOPES, *et al*, 2009).

A modelagem experimental normalmente é feita utilizando-se modelos simples de primeira ordem (lineares) e segunda ordem (quadráticos). Para regiões estreitas do espaço experimental, em geral, o modelo de primeira ordem é aplicado, como ilustra a equação 1 com duas variáveis. No modelo da equação 2 são considerados não só os efeitos principais como as interações entre as variáveis, e o sistema adquire curvatura.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad (1)$$

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2)$$

O modelo de segunda ordem, por sua vez, é mais flexível por poder descrever uma maior variedade de formas e funções, o que o aproxima da correta expressão de processo reais (equação 3).

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3)$$

3 MATERIAL E MÉTODOS

Visando explicitar o desenvolvimento experimental do presente trabalho, apresenta-se a Figura 10, que elucida a rota analítica que leva ao processamento da CA até o emprego de seu hidrolisado, obtido por ação ácida à pressão, como meio fermentativo para a produção de AI. Através da referida figura fica evidenciado o uso de planejamentos multivariados buscando-se a otimização das condições de processo, bem como as ferramentas analíticas utilizadas ao longo do trabalho.

O trabalho conta com uma abordagem em escala semi-micro, miniaturizado, em laboratório analítico-ambiental.

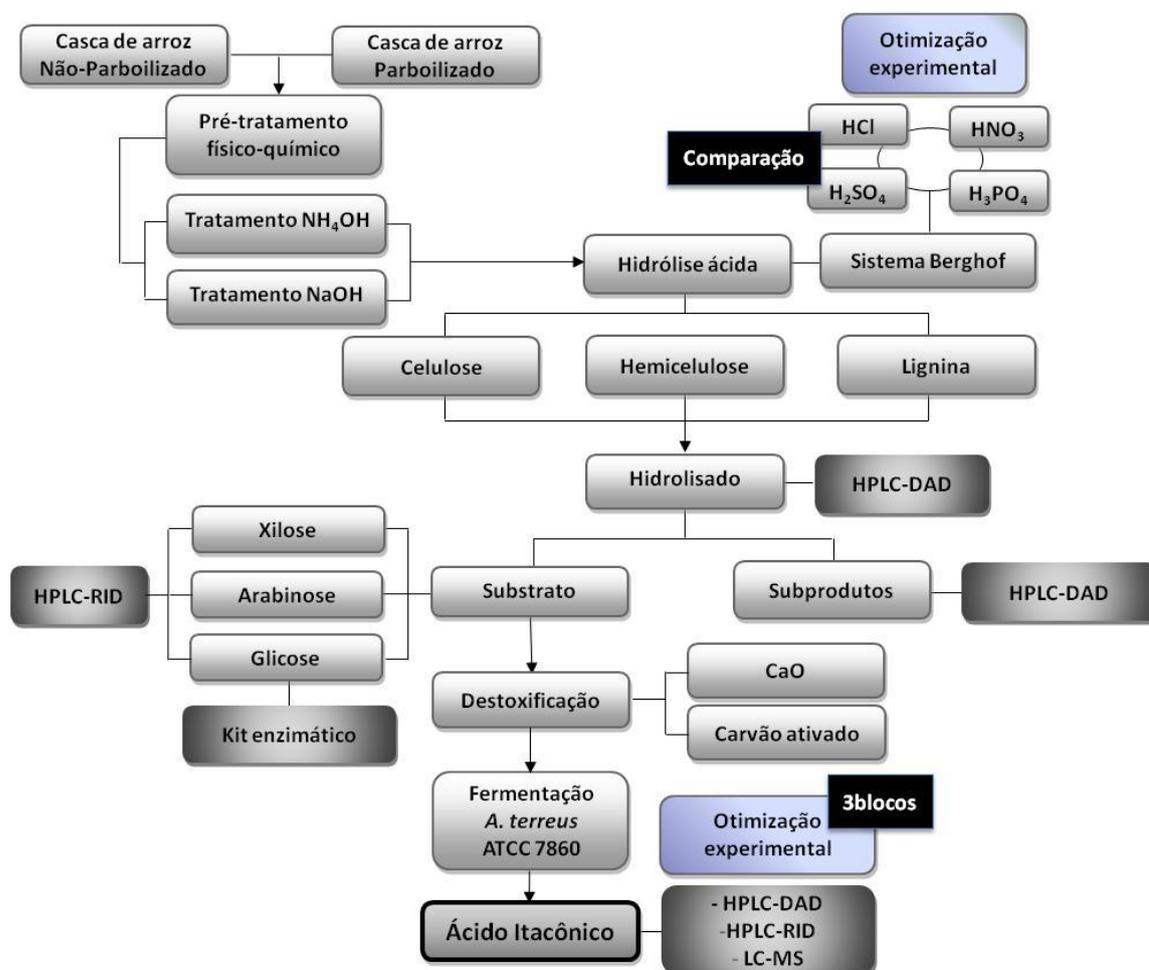


Figura 10 – Fluxograma experimental da produção de ácido itacônico a partir da casca de arroz.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico ou P.A.: ácidos clorídrico, fórmico, nítrico, sulfúrico e fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemanha); ácido acético glacial e metanol (J.T.Baker, Xalostoc, México); ácido itacônico, A-D-glicose anidra, arabinose, xilose e 5-HMF (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha). As soluções injetadas nos cromatógrafos foram preparadas com água ultrapura (Millipore – Direct-Q 3, Billerica, MA, EUA).

3.1 Pré-tratamento da casca de arroz

A CA utilizada nos experimentos foi obtida gratuitamente da empresa de beneficiamento de arroz Alfredo Berleze & Irmãos, localizada em Santa Maria, RS. Inicialmente, a CA foi submetida a pré-tratamento físico, sendo cominuída em moinho analítico de facas (Marconi – TE048, Piracicaba, SP, Brasil) visando aumento da área superficial e redução da cristalinidade da fração lignocelulósica, e, em seguida, as partículas da biomassa foram selecionadas em sistema de peneiras padronizadas, providas de agitação automática (Bertel, Laranjeiras Caieiras, SP, Brasil). As partículas de 48 Mesh (288-312 μm de diâmetro, selecionadas como ideais por estudos prévios não descritos neste trabalho) foram lavadas com água destilada até a obtenção de um filtrado incolor e, então, secas em estufa (Ideal – Greenhouse 1.1, Arujá – SP, Brasil) a 60 °C, por 24 h (Figura 11).



Figura 11 – Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) *in natura*; b) cominuída.

3.1.1 Pré-tratamento químico

Como complemento ao tratamento físico adotado, foi proposta a adição de uma etapa de ação química sobre a CA cominuída, visando facilitar a posterior ação da hidrólise ácida na mesma e, assim, incrementar a produção de açúcares. Foram escolhidos os banhos com hidróxido de amônio 15% m v⁻¹, por 24 h a 60 °C (MENON & RAO, 2012; YOO, LEE & KIM, 2011), e com hidróxido de sódio 5% m v⁻¹, por 1 h a 100 °C (YU *et al*, 2013b; HOSSEINI. & AZIZ, 2013), ambos os tratamentos buscando a delignificação do material.

Encerrado o tempo, o sistema foi filtrado e a CA foi lavada até que se atingisse pH neutro, para então ser seca em estufa a 60 °C por 24 h, e armazenada sobre refrigeração a 4-8 °C, no escuro, até ser usada para hidrólise.

3.2 Hidrólise ácida da casca de arroz

O processo de hidrólise ácida à pressão da CA ocorreu em sistema de abertura de amostras Berghof (Berghof, Eningen, Alemanha). O procedimento consistiu em processar a CA, na proporção de 10% v v⁻¹ do sistema, utilizando-se 1,0 g de CA previamente tratada em vaso de TFMTMPTFE com capacidade de 250 mL, acrescido de 10,0 mL de catalisador ácido diluído (BEVILAQUA, 2010), independentemente da natureza do ácido utilizado. O recipiente, fechado hermeticamente, foi acondicionado em morteiro de aço inox e posicionado em sistema de aquecimento, conforme evidenciado na Figura 12.

A pressão (P) exercida no interior do vaso de digestão foi calculada através do emprego da equação de Van der Waals para os gases reais (Equação 4),

$$\left[P + a \left(\frac{n}{V} \right)^2 \right] (V - nb) = nRT \quad (1) \quad (4)$$

onde n é o número de mols, V é o volume do recipiente (Litros), R é a constante dos gases (0,0082 L atm K⁻¹ mol⁻¹) e T é a temperatura (na escala Kelvin). As constantes

de Van der Waals a ($5,464 \text{ L}^2 \text{ atm mol}^{-2}$) e b ($0,03043 \text{ L mol}^{-1}$) são correções para a equação dos gases reais, sendo parâmetros ajustáveis característicos de cada gás, neste caso estabelecidos para o vapor d'água. A constante a está relacionada com as forças de atração intermoleculares, enquanto a constante b está relacionada com o volume molecular.



Figura 12 – Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida da casca de arroz. Componentes: 1) vaso de teflon; 2) morteiro de aço inox; 3) sistema de aquecimento/resfriamento; 4) controlador de temperatura.

Findado o processo hidrolítico, o sistema é resfriado e desmontado, sendo então as amostras passadas em filtro qualitativo de celulose ($26 \mu\text{m}$) e armazenadas sob refrigeração a $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro, para posterior análise dos produtos e subprodutos formados.

3.2.1 Otimização do processo hidrolítico

Foram executados planejamentos experimentais multivariados visando atingir maior liberação de glicose através do estudo dos efeitos de variáveis e suas interações no processo. Dentre os fatores estudados encontram-se: concentração de ácido (H_3PO_4 ou HNO_3) ($0,65 - 5,95\% \text{ v v}^{-1}$); tempo (28-62 min) e temperatura ($128-162 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo que as pressões variaram de 43 ($128 \text{ }^\circ\text{C}$) a 54 ($162 \text{ }^\circ\text{C}$) bar (os

patamares descritos foram definidos com base em estudos prévios não descritos neste trabalho). Para tanto, fez-se dois planejamentos completos – delineamento composto central rotacional (DCCR) – para as três variáveis independentes, com 8 combinações possíveis para os 2 níveis estudados (2^3), acrescidas dos 6 ensaios axiais e outras 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos em cada planejamento. Os resultados obtidos foram então comparados e discutidos em relação aqueles obtidos em estudos prévios envolvendo os ácidos HCl e H₂SO₄, a fim de se balizar os resultados e compará-los com estes dois ácidos que são os mais amplamente utilizados em etapas hidrolíticas como a proposta neste trabalho. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 4, sendo que os resultados foram avaliados com o auxílio do *software* Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) com uso da ferramenta Experimental Design (DOE) para a análise de variância, construção dos diagramas de Pareto, superfícies de respostas e demais diagramas.

Tabela 4 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento da glicose, xilose e arabinose.

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
H ₃ PO ₄	Concentração de ácido (% v v ⁻¹)	0,85	1,88	3,4	4,92	5,95
	Tempo (min)	28	35	45	55	62
	Temperatura (°C)	128	135	145	155	162
HNO ₃	Concentração de ácido (% v v ⁻¹)	0,65	1,44	2,6	3,76	4,55
	Tempo (min)	28	35	45	55	62
	Temperatura (°C)	128	135	145	155	162

3.2.2 Tratamento do hidrolisado

A partir dos resultados do planejamento experimental do hidrolisado, selecionou-se o experimento que apresentou maior liberação de açúcares para ser utilizado no processo fermentativo. Cada batelada do processo hidrolítico rendeu aproximadamente 5,5 mL, sendo portanto necessária a execução de hidrólises

consecutivas na mesma condição para a obtenção de volume viável à fermentação, visto das demandas de volume e perdas nas etapas de filtração e destoxificação posteriores.

3.2.3 Destoxificação do hidrolisado

Com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos provenientes da etapa hidrolítica, e que atuam por natureza como inibidores na fermentação, o hidrolisado foi submetido a processo de destoxificação, sem o qual, em teste prévios (ver Apêndice A), constatou-se que o meio não era passível de uso como substrato fermentativo.

Para tal, o hidrolisado foi tratado ora com a adição de 2,5% ($m v^{-1}$) de carvão ativo (Synth, Diadema, SP, Brasil), sendo incubado a 50 °C, por 1 h, a 400 rpm (IKA – C-MAG HS 7 S32, Staufen, Alemanha) (RAMBO *et al*, 2013), ora com o emprego de CaO a 60 °C por 1 h, a 400 rpm (IKA – C-MAG HS 7 S32, Staufen, Alemanha) para a regulação do pH, composto proposto para esta função visto sua capacidade de formação de substâncias precipitáveis com compostos como ácidos fórmico e acético (HEREDIA-OLEA, PÉREZ-CARRILLO & SERNA-SALDÍVAR, 2012).

Em seguida, a solução foi passada em filtro qualitativo de celulose (26 μm) e, após, filtrada a vácuo com membrana filtrante de nitrato de celulose (47 mm x 0,45 μm). O pH dos hidrolisados ácidos foi ajustado para o valor desejado (conforme planejamento de experimentos) com solução de NaOH 6 mol L⁻¹ (PHTEC – pHS-3B, Americana, SP, Brasil) (no caso de emprego de carvão ativado) e estocados sob refrigeração a 4-8 °C, no escuro, até a sua utilização.

3.3 Manutenção e inóculo de *Aspergillus terreus*

O micro-organismo empregado no experimento foi *Aspergillus terreus* ATCC 7860, fungo filamentosso produtor de Al, procedente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). A cultura liofilizada foi reativada conforme metodologia pré-estabelecida (INCQS, 2013) e, após, mantida e repicada em meio

comercial Batata Dextrose Ágar (BDA), previamente autoclavado, sendo incubado em estufa com controlador digital de temperatura a 30 °C, por 5 dias. O meio BDA é composto por (g L⁻¹): batata (200,0); glicose (15,0); ágar (15,0). O volume adotado para o inóculo foi definido em 10% do volume total de cultivo, sendo que a concentração celular adotada foi definida e padronizada pela leitura da absorbância do inóculo, no valor de 0,3 ($\lambda=530$ nm) em espectrofotômetro Shimadzu – UV-1800, (Quioto, Japão) empregando o *software* UVProbe, o que corresponde a uma concentração celular de 1×10^7 UFC. O crescimento do micro-organismo ($1:10 v v^{-1}$) foi avaliado por um período de 7 dias.

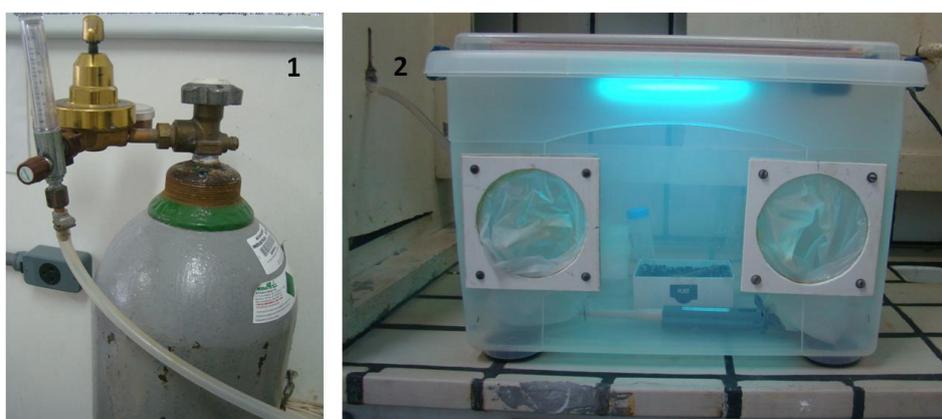


Figura 13 – Caixa-de-luvas empregada na manipulação do micro-organismo: 1) fluxo de N₂, 2) caixa-de-luvas (Glovebox).

Fonte: Adaptado de MONTIPÓ (2012).

Como os experimentos foram desenvolvidos em um laboratório de química analítica, confeccionou-se uma caixa-de-luvas (do inglês, *glovebox*) contendo duas lâmpadas germicidas para a esterilização do ambiente e aberturas nas laterais para a entrada/saída de um fluxo de gás nitrogênio (Figura 13). Com esta medida foi possível o manuseio do fungo *A. terreus*, mesmo em ambiente não-adequado para procedimentos microbiológicos. A assepsia foi comprovada, no ambiente de manuseio do fungo e na estufa utilizada para incubação, pelo controle de contaminação com placas contendo meio Agar Mueller-Hinton (utilizadas em todos os ensaios fermentativos prévios descritos no Apêndice A), atestando resultado

negativo para contaminação por bactérias ou outros possíveis micro-organismos (Figura 14).

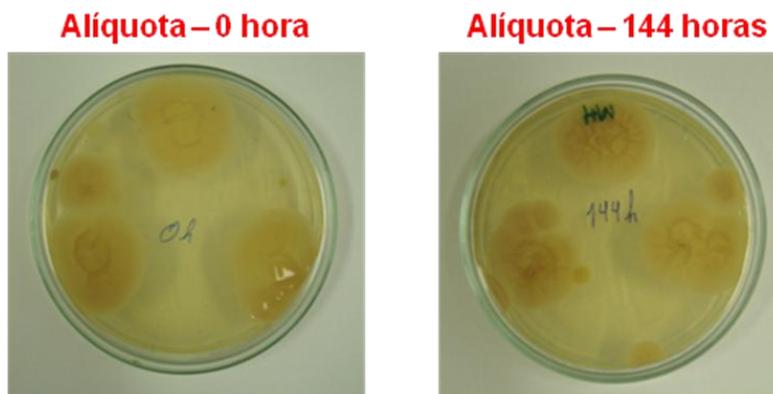


Figura 14 – Plaqueamento do fungo *A. terreus* em meio Mueller-Hinton, indicando que as placas estão isentas de contaminação bacteriana.

3.4 Fermentação a partir da casca de arroz

Os procedimentos de fermentação foram feitos em semi-micro escala, de modo a reduzir custos, consumo de reagentes e uso de espaço físico. Para tanto, foram utilizados frascos de 20 mL para o hidrolisado da CA (Figura 15), a 30 °C, em pH inicial de 6,0. O tempo de cultivo total foi de 204 h, sem agitação, retirando-se alíquotas de 100 μ L a cada 12 h para monitoramento da produção de AI, e 200 μ L para o monitoramento do consumo de glicose.

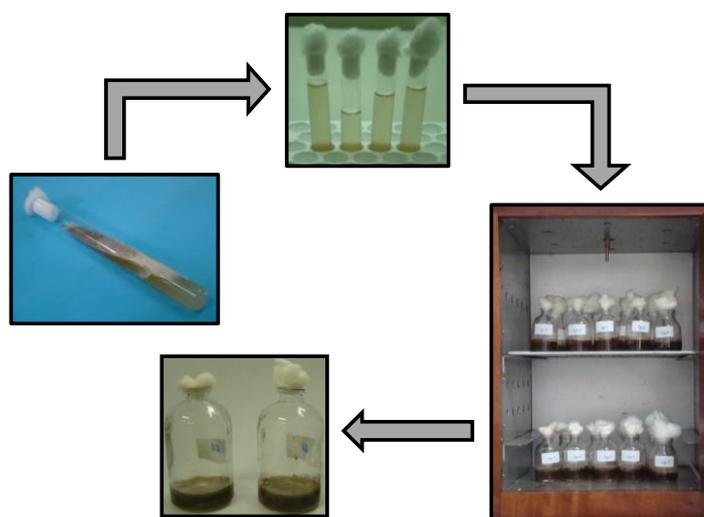


Figura 15 – Processo fermentativo em semi-micro escala.

3.4.1 Otimização do processo fermentativo

Visando empregar um delineamento experimental multivariado como ferramenta essencial para determinar a produção máxima de AI através de *A. terreus*, com a utilização de CA como substrato para a fermentação, foram feitos testes iniciais em relação às variáveis significativas, concentração do inóculo, tempo de cultivo, taxa de crescimento, pH inicial do meio e temperatura (ver Apêndice A).

Com base nos resultados obtidos nos experimentos iniciais, foram então definidos os parâmetros e níveis para estudo através de um planejamento composto multivariado, em blocos, onde a variável fixada no bloco foi a temperatura (26-34 °C) visto haver apenas uma estufa à disposição, e os demais fatores estudados foram: pH (4,5-6,5), origem da CA (parboilizado e não-parboilizado) e extrato de levedura (Acumedia, Lansing, MI, EUA) (0-10,0 g L⁻¹).

O primeiro bloco, com temperatura em 30 °C, consistiu no estudo de três variáveis independentes, com três níveis em cada variável, gerando oito combinações acrescidas de um ensaio no ponto central, totalizando nove experimentos. Os níveis utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 5. Os resultados foram avaliados através do *software* Statistica 8.0.

Tabela 5 – Valores utilizados no primeiro bloco do delineamento composto central para a determinação do rendimento do ácido itacônico.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH Inicial	4,5	5,0	5,5
Origem CA	100% Não-Parb.	1:1 Parb./Não-Parb.	100% Parb.
Extrato de levedura (g L ⁻¹)	0	5,0	10,0

Concluída a fermentação relativa ao bloco de ensaios a 30 °C e, após análise destes resultados, foi possível retirar do planejamento a variável de menor significância do processo fermentativo (origem da CA), podendo-se então analisar melhor os efeitos das demais variáveis independentes.

Assim, o segundo bloco com temperatura em 26 °C, e o terceiro bloco com temperatura em 34 °C, consistiram no estudo de duas variáveis independentes, com

três níveis em cada variável, gerando quatro combinações acrescidas quatro pontos axiais e um ensaio no ponto central, totalizando nove experimentos em cada bloco. Os níveis utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 6. Os resultados foram avaliados, novamente, através do *software* Statistica 8.0.

Tabela 6 – Valores utilizados no segundo e terceiro blocos do delineamento composto central, com pontos axiais, para a determinação do rendimento do ácido itacônico.

Variáveis	Níveis				
	-2,0	-1	0	+1	+2,0
pH inicial	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
Extrato de levedura (g L ⁻¹)	0	2,5	5,0	7,5	10,0

A partir dos resultados do planejamento experimental do fermentado, selecionou-se o ensaio que apresentou maior rendimento de AI e refez-se a fermentação, em duplicata. O tempo de cultivo total foi de 204 h, retirando-se alíquotas de 200 µL, a cada 12 h, para acompanhamento do consumo de glicose, xilose, arabinose e produção de AI, por meio de espectrofotometria e HPLC-RID/DAD.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinação analítica por HPLC-RID

A concentração dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) produzidos no processo hidrolítico ácido da CA, bem como o consumo destes por *A. terreus* durante a etapa fermentativa, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RID). O sistema cromatográfico empregado foi um equipamento Shimadzu (Tokio, Japão) equipado com desgaseificador DGU-20A₅, bomba quaternária LC-20AT, controlador do sistema CBM-20A, amostrador automático SIL-20A, forno para coluna CTO-20A,

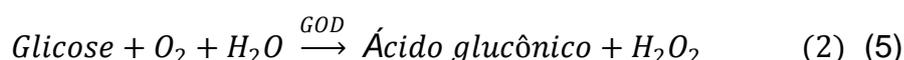
detector de índice de refração RID-10A e *software* LCsolution. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 7. Para tanto, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10 *v v*⁻¹) e, após, passadas em filtro para seringa com membrana politetrafluoretileno (PTFE 13 mm x 0,22 µm). Os filtros utilizados (contendo material particulado e frações de micélio fúngico) eram então autoclavados e devidamente descartados.

Tabela 7 – Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise e fermentação.

Condições cromatográficas	
Coluna	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm – 9 µm partícula)
Temperatura	40 °C
Fase móvel	Água ultrapura contendo 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄
Vazão	0,4 mL min ⁻¹
Modo de Eluição	Isocrático
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	15,3 min (glicose), 16,3 min (xilose) e 17,7 min (arabinose), 22,0 min (Ácido Itacônico), 22,8 min (Ácido acético) e 23,9 min (Ácido Fórmico)

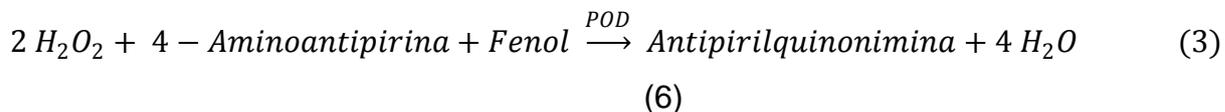
3.5.2 Determinação da glicose por método enzimático

A análise da glicose foi efetuada igualmente mediante emprego de método enzimático com o kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio de funcionamento desta abordagem reside no processo de oxidação da glicose, reação essa que é catalisada pela glicose oxidase (GOD), o que leva à formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (Equação 5).



O peróxido de hidrogênio formado, por sua vez, reage com 4-aminoantipirina e fenol, isso sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja

intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra (Equação 6), medição essa feita em espectrofotômetro.



Para o procedimento analítico, adicionaram-se 20 µL de amostra em 2,0 mL do reagente enzimático, sendo a solução resultante incubada em banho-maria a 37 °C, por 15 min, juntamente com o padrão e o branco. A absorbância do teste foi determinada a 505 nm.

A concentração da glicose (g L⁻¹) foi determinada através da construção da curva analítica, com análise de figuras de mérito. Sempre que a amostra apresentava concentração superior a faixa de linearidade, foi feita diluição com solução de NaCl 0,15 mol L⁻¹ antes de nova medição dentro na faixa de linearidade do método espectrofotométrico.

3.5.3 Determinação analítica por HPLC-DAD

As análises das concentrações de alguns subprodutos, além do AI, foram feitas também por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD). As análises de fermentado, bem como as concentrações de ácido acético e 5-HMF no hidrolisado foram determinadas e quantificadas dessa forma. Para tanto, foi empregado um sistema (Shimadzu, Quioto, Japão) constituído por uma bomba quaternária LC-20AT, desgaseificador DGU-20A₅, amostrador automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e o *software* LC Solution. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 8.

O preparo das amostras consistiu apenas na diluição destas em água ultrapura (1:10 v v⁻¹) e, após, etapa de filtração com filtro para seringa dotado de membrana em ester celulose (MCE 33 mm x 0,45 µm). A aparência da solução, após a filtração, adquire aspecto límpido tendendo a ser transparente, enquanto o

filtro mencionado (com o material particulado retido, inclusive frações de micélio fúngico), sofre autoclavagem e é então devidamente descartado.

Tabela 8 – Condições cromatográficas (HPLC-DAD) utilizadas na determinação de ácido itacônico, fórmico, acético e 5-HMF.

Condições cromatográficas	
Coluna	Mediterranea sea 18 (150 mm x 40 mm, $\Phi = 3 \mu\text{m}$)
Fase aquosa	Água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico
Fase orgânica (2%)	Metanol contendo 1% de ácido fórmico
Vazão	0,4 mL min ⁻¹
Modo de Eluição	Isocrático
Volume de injeção	20 μL
Detecção (λ)	210 nm
Tempo de retenção	5,8 min (ácido acético), 6,3 min (ácido fórmico), 12,3 min (ácido itacônico) e 20,7 min (5-HMF)

3.5.4 Determinação analítica por UHPLC-MS/MS

As análises cromatográficas do analito AI necessitaram de confirmação analítica através de uma metodologia mais sensível que aquela obtida via detecção HPLC-RID e HPLC-DAD. Assim, um sistema de cromatografia líquida de alta performance UHPLC-MS/MS (Waters/EUA) equipado com modelo Acquity UPLCTM Xevo TQTM MS/MS, dotado de detector triplo quadrupolo, operando em modo de monitoramento de reações (fragmentações subseqüentes no detector) foi utilizado. A coluna escolhida para a separação cromatográfica foi Acquity UPLCTM BEH C18 (50 mm x 2.1 mm d.i., 1.7 μm tamanho de partícula). A aquisição dos dados foi feita usando o software MassLynx 4.1 (Waters, USA), sendo o espectrômetro de massas operado por ESI no modo positivo (Tabela 9).

Para a identificação do analito quatro transições (m/z) foram identificadas e monitoradas, 131>73, 133>73, 131>99, e 133>101, utilizando-se a voltagem no cone de 10 voltz, e energia de colisão de 7 voltz para as duas primeiras citadas, e 6 voltz para as duas últimas.

Tabela 9 – Condições cromatográficas (UHPLC-MS/MS) utilizadas na identificação de ácido itacônico.

Condições cromatográficas	
Ácido Itacônico	
Modo de operação	ESI ⁺
Temperatura	Fonte (150 °C), Dessolvatação (450 °C)
Voltagem	2 kV
Vazão	Vazão (0,3 mL min ⁻¹), Dessolvatação (900 L h ⁻¹), Cone (150 L h ⁻¹)
Gás de Eluição	0,15 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	1,02 min (Tempo total = 3 min)

3.6 Cálculos de rendimento e produtividade

Após a determinação das concentrações de glicose, xilose e arabinose, o rendimento (R) destes sacarídeos foi calculado a partir da quantidade de açúcares produzida (mg) pela quantidade de CA utilizada (g), relação essa ilustrada na Equação 7, sendo válido isso para a etapa hidrolítica. Os cálculos de rendimento do AI (R_{AI}) envolveram a razão entre a quantidade de AI produzido (mg) e a quantidade de açúcares utilizada (g) na fermentação, conforme a Equação 8.

$$R = \frac{\text{mg açúcar}}{\text{g CA}} \quad (7)$$

$$R_{AI} = \frac{\text{mg AI}}{\text{g açúcares}} \quad (8)$$

3.7 Gerenciamento de resíduos

No decorrer das atividades e etapas unitárias de produção do AI a partir da CA, os resíduos provenientes da etapa hidrolítica ácida à pressão foram armazenados para aproveitamento em trabalhos futuros, enquanto os resíduos biológicos da etapa fermentativa foram previamente esterilizados (autoclavados) antes do seu descarte. Os resíduos químicos oriundos das análises cromatográficas, caracterizados pelos reagentes em geral e solventes orgânicos, são, primeiramente, segregados e, após, encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da UFSM, responsável pela destinação final via empresa nacional, autorizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações Analíticas

4.1.1 Métodos cromatográficos

Fez-se uso de abordagens analíticas e quimiométricas nos procedimentos envolvendo as análises cromatográficas visando as melhores condições de análise. Esse processo foi desenvolvido antes da execução das análises com amostras dos procedimentos hidrolíticos e fermentativos. Para assegurar a qualidade da informação analítica gerada ao longo deste trabalho, foram avaliados no método analítico a faixa linear da curva de calibração, o coeficiente de determinação (r^2), bem como os limites de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente) tendo sido estabelecidos como parâmetros confiáveis e interpretáveis para cada um dos analitos estudados nas respectivas amostras.

O limite de detecção (LD) foi calculado como o menor nível de concentração no qual o composto estudado foi identificado com uma razão sinal/ruído (S/N) > 3,0. O limite de quantificação (LQ) foi definido como o menor nível de concentração em que o composto apresentou razão S/N > 10, com auxílio de soluções padrão (INMETRO, 2014).

4.1.2 Determinação com HPLC-RID

O método de determinação dos açúcares por HPCL-RID foi desenvolvido com o auxílio das soluções-padrão de glicose, xilose e arabinose (seção 3.5.1), As figuras-de-mérito obtidas para os açúcares e para os subprodutos estão expostas na Tabela 10. Os r^2 obtidos para as curvas de calibração na faixa linear de trabalho

evidenciam linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação dos analitos, pertencentes à complexa matriz hidrolítica, pelo método de padrão externo.

O modelo de regressão linear mostrou-se adequado para as determinações analíticas em estudo, uma vez que os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 para todos analitos. O INMETRO recomenda que o r^2 seja igual ou superior a 0,90. Os LQs e LDs foram adequados para quantificação dos analitos e acompanhamento do bioprocessamento. Os limites do método são os mesmos do instrumento para os analitos em estudo, uma vez que não há etapas de preparo e pré-concentração das amostras.

Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a determinação dos analitos e subprodutos.

Analitos	Equação da reta	Faixa linear (g L ⁻¹)	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Glicose	y = 201882,6x - 53884,07	1,0 - 10,0	0,9991	8,9	29,0
Xilose	y = 146810x - 5895,75	1,0 - 10,0	0,9988	12,0	39,0
Arabinose	y = 255316x - 22432,98	1,0 - 10,0	0,9988	6,9	22,0
Ácido Itacônico	y = 227076x + 10187,91	0,05 - 10,0	0,9997	30,0	100,0
5-HMF	y = 235031,6x - 8908,8	0,05 - 10	0,99	2,2	7,2
Ácido Acético	y = 155808x - 28382,43	0,05 - 10	0,9662	9,9	32,0
Ácido Fórmico	y = 71111,86x + 4198,97	0,1 - 10,0	0,9965	5,0	16,0

4.1.3 Determinação com HPLC-DAD

O método de determinação do ácido itacônico, por HPLC-DAD, foi feito com soluções-padrão (seção 3.5.3) tendo sido testada a estabilidade das mesmas. Para isso, 3 soluções idênticas de 250,0 mg L⁻¹ foram preparadas, sendo colocadas sob refrigeração (I), sobre a bancada (com o frasco revestido impedindo passagem de luz (II) e sobre a bancada em frasco transparente (III). Foi constatado que em até 21 dias (3 semanas) não havia diferença detectável para a solução armazenada sob refrigeração (4-8 °C no escuro). A partir deste ponto um desvio (0,9% começou a ser identificado em relação à concentração inicial. Em comparação a esse resultado, as soluções deixadas à temperatura ambiente (na claridade ou no escuro)

apresentaram desvio (>6,86%) em relação à concentração inicial já nos primeiros 7 dias.

As figuras de mérito obtidas para as análises em HPLC-DAD podem ser visualizadas na Tabela 11, que evidencia, através do coeficiente de determinação obtido (>0,99), a possibilidade de análise quantitativa dentro da faixa linear de trabalho.

Tabela 11 – Figuras de mérito para determinação analítica por HPLC-DAD.

Analitos	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido Itacônico	1 - 500	y=112996,8x - 201354	0,992	1,4	4,8
Ácido Acético	1 - 200	y=1565,536x + 22,943	0,995	0,1	0,5
Ácido fórmico	1 - 200	y=170,674x - 7772,1	0,998	0,1	0,3
5-HMF	0,5 - 1500	y=21316,2x - 509,6	0,995	0,05	0,1

4.1.4 Determinação por espectrofotometria

O método de determinação de glicose utilizando o espectrofotômetro somado ao emprego do Kit Enzimático descrito na seção 3.5.2, foi desenvolvido com o auxílio das soluções-padrão de glicose contidas no referido kit. As figuras-de-mérito obtidas para a glicose estão expostas na Tabela 12. O valor de r² obtido para a curva de calibração, na faixa linear de trabalho, evidencia linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação da glicose.

Tabela 12 – Figuras-de-mérito para a determinação de glicose.

Analito	Equação da reta	Faixa linear (g L ⁻¹)	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Glicose	y = 0,3321x - 0,0151	0,1 - 2,5	0,9987	30,0	100,0

Se comparados aos valores obtidos para a determinação de glicose através de HPLC-RID, percebe-se que, embora o valor para r² não tenha sofrido grande

alteração, as demais figuras de mérito possuem significativa variação. Assim, a linearidade para a determinação espectrofotométrica é inferior (restrita entre 0,1 - 2,5 g L⁻¹, enquanto a faixa linear em HPLC-RID fica entre 1,0 - 10,0 g L⁻¹), e os valores de LD e LQ ficam acima daqueles obtidos através da técnica cromatográfica, o que indica que apesar de robusta, a técnica é menos sensível para a determinação de glicose.

4.2 Hidrólise ácida da casca de arroz

4.2.1 Otimização da hidrólise ácida

Para o processo de hidrólise ácida à pressão, foram desenvolvidas estratégias de planejamento multivariado que pudessem ser aplicados ao estudo das variáveis do processo, e que envolvessem um número reduzido de medidas sem deixar de analisar um amplo espaço amostral. Isto foi executado tanto para o ácido fosfórico como para o ácido nítrico, e não somente a influência das variáveis foi analisado como também o sinergismo entre tais variáveis independentes do processo e suas influências na produção da glicose, xilose e arabinose. Os fatores analisados nas hidrólises ácidas diluídas, conforme descrito na seção 3.2.1, foram: concentração de ácido (0,65 - 5,95% v v⁻¹), tempo (28 - 62 min) e temperatura (128 - 152 °C). Nas Tabelas 13 e 14 encontram-se os valores codificados dos ensaios experimentais, e os resultados obtidos, sendo que os valores foram obtidos via HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 13, as concentrações de glicose variaram de 1,33-5,4 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 8,0-32,4 mg glicose g⁻¹ CA (ou 0,8-3,2% m m⁻¹), as concentrações de xilose variaram de 5,5-38,9 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 33,0-233,4 mg xilose g⁻¹ CA (ou 3,3-23,3% m m⁻¹) e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,4-2,8 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 2,4-16,8 mg arabinose g⁻¹ CA (ou 0,2-1,7% m m⁻¹) para o H₃PO₄. Os resultados demonstram a influência das variáveis independentes na resposta final. A exigência dos três pontos centrais para a resposta desejada é definida pela

obtenção da informação acerca da reprodutibilidade do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Tabela 13 – Resultados do delineamento composto central rotacional, para o ácido fosfórico, com os fatores resposta.

Ensaio	H ₃ PO ₄ (% v v ⁻¹)	Tempo (min)	Temp. (°C)	H ₃ PO ₄					
				C _{Glicose}	R _{Glicose}	C _{Xilose}	R _{Xilose}	C _{Arabinose}	R _{Arabinose}
1	-1	-1	-1	1,8	19,4	5,5	58,9	1,9	20,4
2	1	-1	-1	1,3	14,4	28,5	307,6	2,1	23,0
3	-1	1	-1	2,6	28,4	15,3	165,5	1,8	20,0
4	1	1	-1	2,3	25,0	31,1	336,5	2,2	23,4
5	-1	-1	1	3,4	37,1	31,9	344,0	2,0	22,2
6	1	-1	1	3,1	33,9	31,4	339,2	2,1	22,8
7	-1	1	1	4,0	43,2	33,0	356,6	2,0	22,0
8	1	1	1	3,2	34,9	33,0	356,6	2,2	24,2
9	-1,68	0	0	1,3	14,4	15,4	166,5	0,4	4,7
10	1,68	0	0	5,4	58,5	17,7	191,0	0,4	4,7
11	0	-1,68	0	3,8	40,7	38,9	420,2	1,8	19,1
12	0	1,68	0	4,0	43,3	31,3	338,3	2,5	27,1
13	0	0	-1,68	3,9	42,5	30,9	333,3	2,0	22,2
14	0	0	1,68	4,0	43,6	29,7	320,3	1,9	20,0
15	0	0	0	3,5	37,7	29,1	314,6	1,8	19,3
16	0	0	0	3,7	39,5	32,3	349,1	2,8	30,3
17	0	0	0	3,7	40,4	28,0	303,0	1,7	18,8

C = concentração (g L⁻¹), R= rendimento = (mg g⁻¹ CA)

Desvio padrão = ± 0,45 (g L⁻¹)

De acordo com a Tabela 14, para o planejamento envolvendo HNO₃ as concentrações de glicose variaram de 2,3-5,4 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 13,8-32,4 mg glicose g⁻¹ CA (ou 1,4-3,2% m m⁻¹), as concentrações de xilose variaram de 17,7-34,5 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 106,2-207,0 mg xilose g⁻¹ CA (ou 10,6-20,7% m m⁻¹) e, para as concentrações de arabinose, a variação foi de 0,4-3,4 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 2,4-20,4 mg arabinose g⁻¹ CA (ou 0,2-2,0% m m⁻¹).

Através do planejamento projetado, percebe-se que reações contendo 3,4% (v v⁻¹) de ácido e incubadas a 145 °C por 28 min (experimento 11) apresentaram concentrações superiores de açúcares liberados: 44,4 g L⁻¹, indicando um

rendimento de 266,4 mg açúcares g^{-1} CA (ou 26,6% $m m^{-1}$) em hidrolisados com H_3PO_4 ; enquanto para as hidrólises com HNO_3 , o ensaio contendo 3,76% ($v v^{-1}$) de ácido e incubadas a 135 °C por 35 min (experimento 2) resultou em 42,0 $g L^{-1}$, de açúcares liberados, indicando um rendimento de 252,0 mg açúcares g^{-1} CA (ou 25,2% $m m^{-1}$).

Tabela 14 – Resultados do delineamento composto central rotacional, para o ácido nítrico, com os fatores resposta.

Ensaio	HNO_3 (% $v v^{-1}$)	Tempo (min)	Temp. (°C)	HNO_3					
				$C_{Glicose}$	$R_{Glicose}$	C_{Xilose}	R_{Xilose}	$C_{Arabinose}$	$R_{Arabinose}$
1	-1	-1	-1	3,4	37,0	30,8	332,5	3,4	37,0
2	1	-1	-1	4,9	52,6	34,5	372,8	2,6	28,3
3	-1	1	-1	3,6	39,0	30,9	333,8	3,0	32,0
4	1	1	-1	4,6	50,0	27,7	299,0	2,7	29,3
5	-1	-1	1	4,0	43,6	33,5	362,2	2,9	31,9
6	1	-1	1	4,8	52,0	25,8	278,2	2,6	28,3
7	-1	1	1	3,5	37,6	27,0	291,5	0,4	4,7
8	1	1	1	4,9	53,0	20,9	225,3	1,3	14,2
9	-1,68	0	0	2,3	24,5	25,6	276,7	2,3	24,4
10	1,68	0	0	5,4	58,5	17,7	191,0	0,8	9,2
11	0	-1,68	0	3,5	37,8	29,5	318,6	1,8	19,1
12	0	1,68	0	4,0	43,3	31,9	344,7	2,5	27,1
13	0	0	-1,68	3,9	42,5	30,9	333,3	2,0	22,2
14	0	0	1,68	4,0	43,5	29,7	320,3	1,9	20,0
15	0	0	0	3,5	37,7	29,1	314,6	1,8	19,3
16	0	0	0	3,7	39,5	32,3	349,2	1,8	19,2
17	0	0	0	3,7	40,4	28,0	303,0	1,7	18,8

C = concentração ($g L^{-1}$), R= rendimento = ($mg g^{-1}$ CA)

Desvio padrão = $\pm 0,45$ ($g L^{-1}$)

O experimento 1 da Tabela 13, empregando 1,88% ($v v^{-1}$) de ácido fosfórico, incubados a 135 °C por 35 min, demonstram que tais condições são demasiadas brandas, sendo assim ineficazes na quebra da matriz lignocelulósicas e, por isso, geraram apenas 9,1 $g L^{-1}$ de açúcares liberados, indicando um rendimento de 54,6 mg açúcares g^{-1} CA (ou 5,5% $m m^{-1}$). Ademais, o experimento 10 da Tabela 14, empregando 4,55% ($v v^{-1}$) de ácido nítrico, processado a 145 °C por 45 min, obteve os piores resultados (24,0 $g L^{-1}$ de açúcares liberados, indicando um rendimento de

144,0 mg açúcares g⁻¹ CA ou 14,4% *m m*⁻¹) dentro do planejamento executado, o que indica que concentrações elevadas do referido ácido são indesejáveis para a liberação dos açúcares fermentescíveis, uma vez que tal ácido deve ter degradado estes compostos em cadeias carbônicas ainda menores.

Posteriormente, a matriz contida na Tabela 13 foi processada com auxílio do *software* Statística 8.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% ($p < 0,05$). As equações 9 e 10, representando os tratamentos com H₃PO₄, descrevem as concentrações de xilose e arabinose, respectivamente, previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. O resultado da análise de variância (ANOVA) para os ácidos estudados está apresentado na Tabela 15.

$$C_x = 29,826 + 3,094[H_3PO_4] - 4,898[H_3PO_4]^2 + 3,435(\text{temp.}) - 4,914[H_3PO_4] \times (\text{temp.}) \quad (9)$$

$$C_a = 2,074 - 0,462[H_3PO_4]^2 \quad (10)$$

Tabela 15 – Análise de variância para o emprego de ácido fosfórico.

Fator Resposta	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Conc. Xilose	Regressão	814,65	4	203,66	29,52
	Resíduos	26,4	12	2,2	
	Total	841,05	16		
Conc. Arabinose	Regressão	2,82	1	2,82	13,69
	Resíduos	0,29	15	0,019	
	Total	3,11	16		

$$r^2 = 76\%, \text{ e } F_{4, 12; 0,05} = 2,85; r^2 = 65\% \text{ e } F_{1, 15; 0,05} = 4,49.$$

A ANOVA da Tabela 15 demonstra o quanto os modelos são eficazes em descrever corretamente as respostas das concentrações de xilose e arabinose em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, indicando serem adequados. Os valores do r^2 asseguram que 76% (para xilose) e 65% (para arabinose) dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático, sendo que o F calculado foi significativo ($p < 0,05$). No caso particular

das medidas das concentrações obtidas de xilose, o valor de F obtido foi aproximadamente dez vezes superior ao valor do F tabelado, o que satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno. A ausência do fator resposta para a glicose pode ser explicada tendo-se em vista de que não houve variável estatisticamente significativa dentro do planejamento proposto.

As equações 11 e 12, representando os tratamentos com HNO₃, descrevem as concentrações de glicose e xilose, respectivamente, previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. O resultado da análise de variância (ANOVA) para os ácidos estudados está apresentado na Tabela 16.

$$C_g = 3,607 + 0,730[\text{HNO}_3] \quad (11)$$

$$C_x = 30,844 - 1,958[\text{HNO}_3] - 2,823[\text{HNO}_3]^2 \quad (12)$$

Tabela 16 – Análise de variância para o emprego de ácido nítrico.

Fator Resposta	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Conc. Glicose	Regressão	7,27	1	7,27	44,51
	Resíduos	1,14	15	0,076	
	Total	8,41	16		
Conc. Xilose	Regressão	222,16	2	111,08	21,62
	Resíduos	79,24	14	7,2	
	Total	301,4	16		

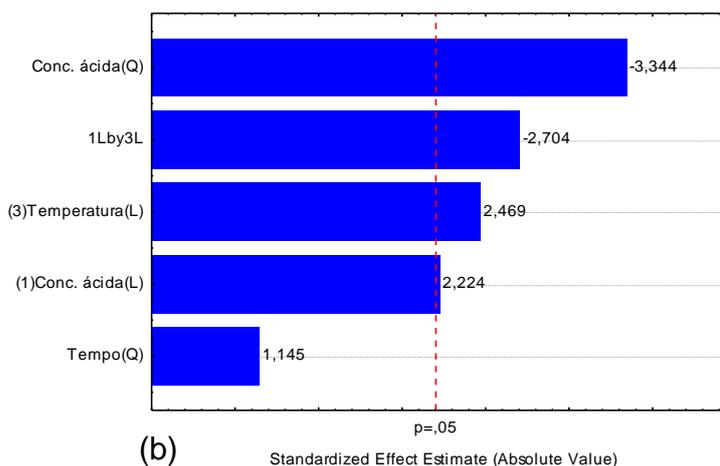
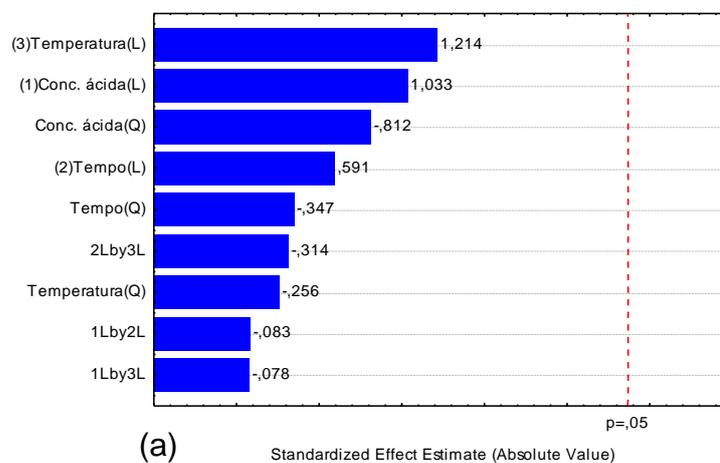
$$r^2 = 87\%, \text{ e } F_{1, 15; 0,05} = 4,49; r^2 = 77\% \text{ e } F_{2, 14; 0,05} = 3,63.$$

A ANOVA da Tabela 16 demonstra o quanto os modelos se apresentam habilitados para descrever corretamente as respostas das concentrações de glicose e xilose em função das variáveis investigadas, constando que os parâmetros estatisticamente significativos indicam serem adequados os modelos adotados. Os valores do r^2 asseguram que 87% (para glicose) e 77% (para xilose) dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático, sendo que o F calculado foi significativo ($p < 0,05$). Quanto ao fator resposta referente a glicose, o valor de F obtido foi aproximadamente dez vezes superior ao valor do F tabelado, enquanto o

valor F obtido para xilose ficou cerca de sete vezes maior que o valor de F tabelado. Ambas as situações satisfazem os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno. A ausência do fator resposta para a arabinose, na Tabela 16, foi proposital já que não houve variável estatisticamente significativa dentro do planejamento aplicado, logo não há sentido em exibir esses dados.

Os dados obtidos dos ensaios, analisados através dos diagramas de Pareto, (tratamentos com H_3PO_4 quanto para HNO_3) (Figuras 16 e 17) evidenciam os valores do teste t para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado segundo matriz pré-concebida para os 17 ensaios experimentais, sendo então as variáveis: a concentração de ácido ($\%v v^{-1}$), tempo (min) e temperatura ($^{\circ}C$).

Quanto aos diagramas de Pareto (tratamentos com HNO_3), os mesmos evidenciam os valores do teste t para cada uma das variáveis independentes inseridas no planejamento multivariado, sendo elas a concentração de ácido ($\%v v^{-1}$), tempo (min) e temperatura ($^{\circ}C$).



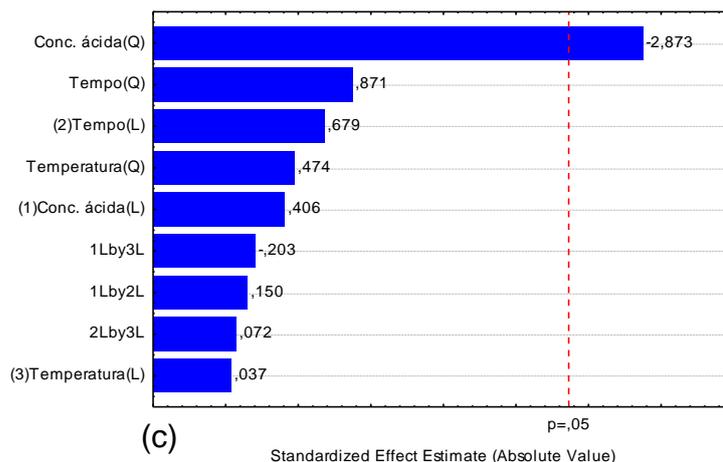


Figura 16 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional empregando ácido fosfórico, com os fatores resposta para liberação de glicose (a), xilose (b) e arabinose (c).

A produtividade de glicose se mostrou influenciada estatisticamente ($p < 0,05$) apenas pela concentração ácida (HNO_3) de forma linearmente positiva, ou seja, a variação de -1,68 até 1,68 na variável referente ao montante de ácido no meio implica em maior liberação de glicose a partir da CA (Figura 17, a). Quando se analisou a produção de xilose, a concentração ácida (H_3PO_4) foi relevante estatisticamente, sendo tanto para o modelo linear quanto para o modelo quadrático, ambos de forma negativa (Figura 17, b). Ademais, o diagrama de Pareto para a produção de arabinose (Figura 17, c) indica que nenhuma das variáveis e interações do modelo foi capaz de afetar o fator resposta (produção de arabinose) de forma significativa.

As representações gráficas das respostas, dispostas na Figura 18, relativas às investigações da produção de xilose e arabinose, auxiliam na visualização dos resultados. De forma sucinta é possível constatar-se que a maior produção de açúcar (xilose ou arabinose) situa-se na região onde se empregam faixas intermediárias de concentrações ácidas (H_3PO_4). E ainda, que as variáveis tempo e temperatura proporcionaram melhores resultados quando as condições experimentais se aproximaram dos pontos axiais (extremos) do planejamento estatístico, e que portanto o ponto central não apresenta a maior produtividade. O mesmo raciocínio pode ser feito para o estudo envolvendo ácido nítrico quanto à produtividade de glicose e xilose.

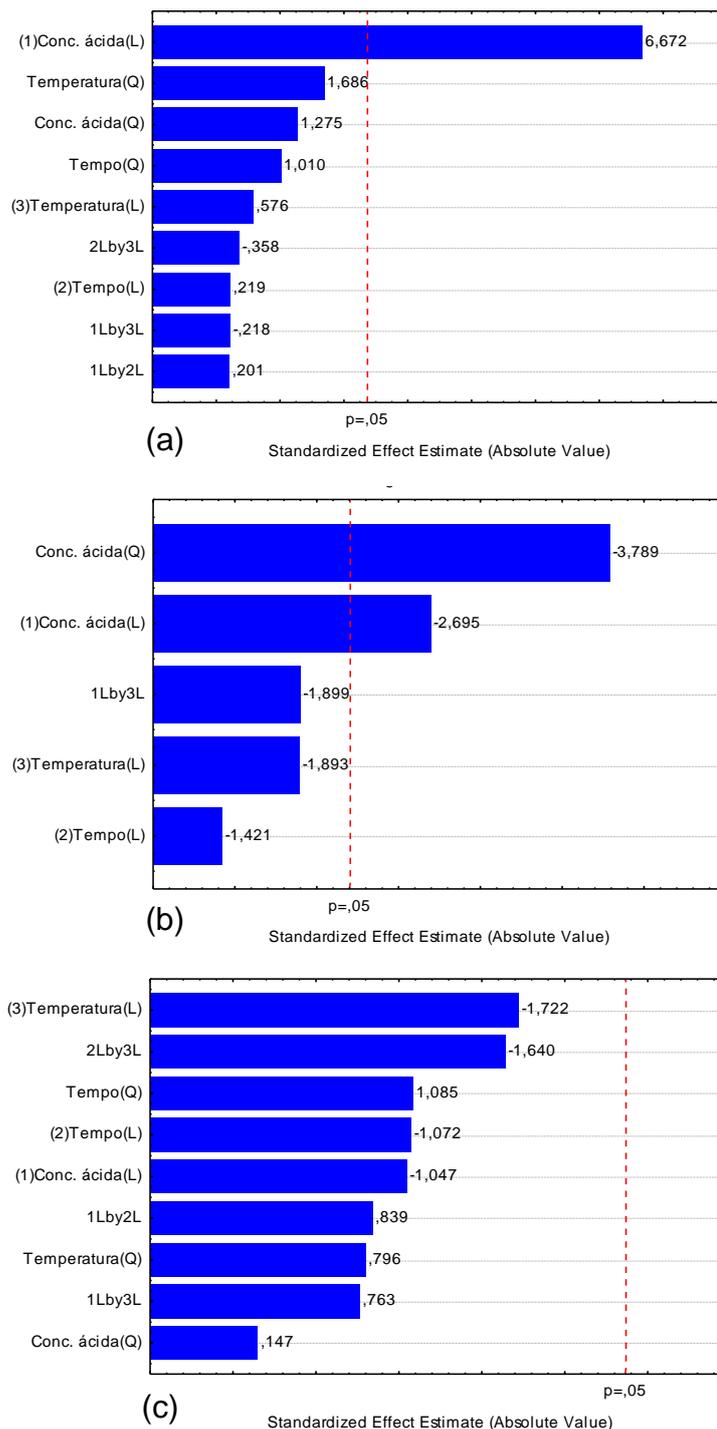


Figura 17 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional empregando ácido nítrico, com os fatores resposta para glicose (a), xilose (b) e arabinose (c).

A Figura 18 demonstra que as faixas ótimas referentes às concentrações de ácidos empregadas foram de 1,88-4,92% ($v v^{-1}$) para H_3PO_4 , porém para a variável tempo o perfil experimental obtido indica que o ponto central não oferece as

melhores condições, que são obtidas apenas nos pontos axiais (extremos) do planejamento multivariado empregado (em cerca de 28 min ou acima de 55 min). Isso gera implicações na compreensão do modelo, visto que tal comportamento parece indicar que esta variável não apresenta caráter significativo se comparada à magnitude da concentração ácida, o que corrobora o perfil descrito pelos diagramas de Pareto discutidos anteriormente.

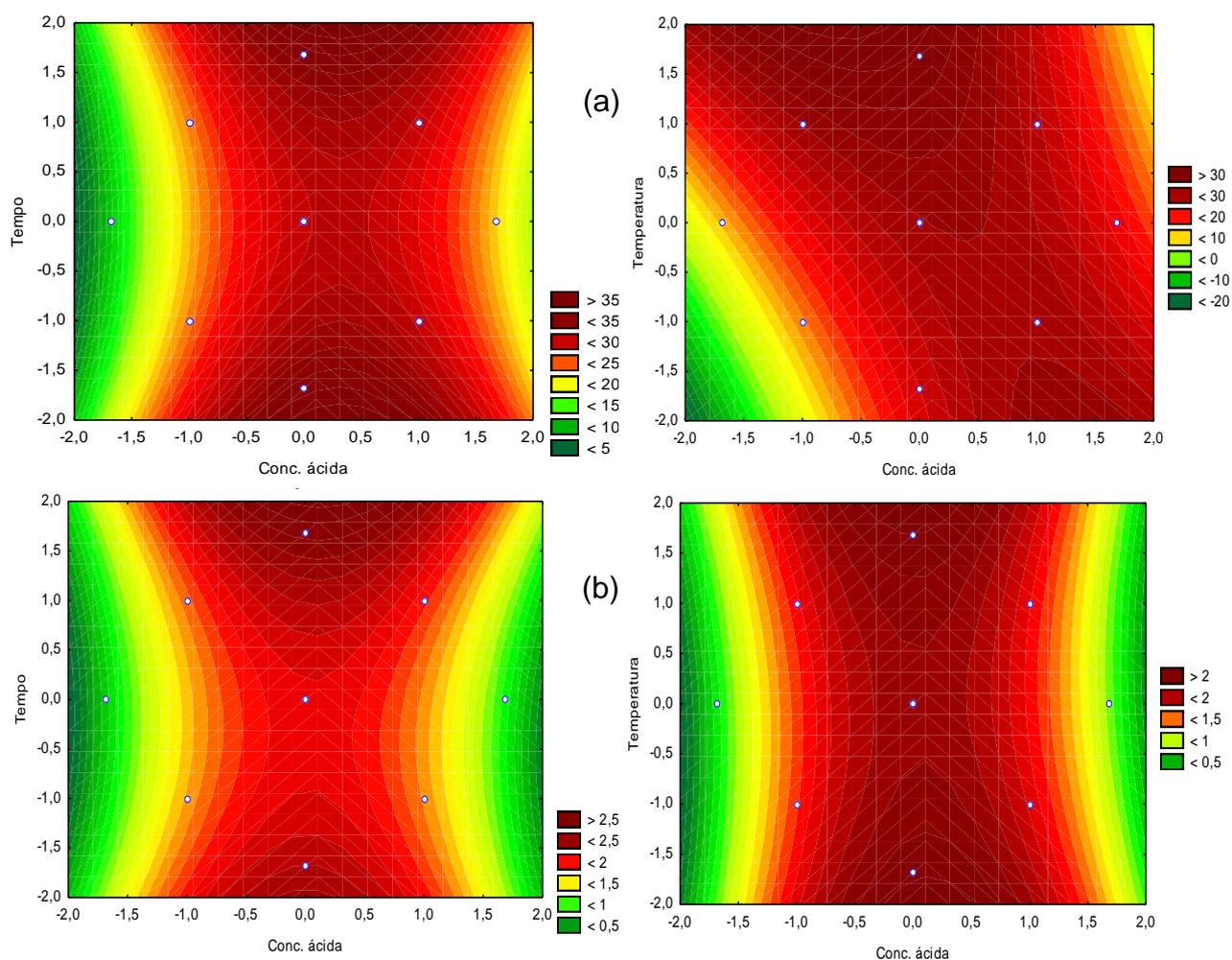


Figura 18 – Curvas de contorno para a concentração de xilose (g L^{-1}) (a) e arabinose (b) envolvendo tratamentos com H_3PO_4 em função do tempo x concentração de ácido e temperatura x concentração de ácido.

Em se tratando da combinação entre temperatura e concentração ácida, o perfil obtido se distingue do anterior (para o caso da xilose) por indicar que os melhores resultados (maior liberação de açúcares fermentescíveis) situam-se nas

regiões com maiores faixas de temperatura (acima de 155 °C) caso a concentração ácida (H_3PO_4) não seja superior à 3,4% $v v^{-1}$, e na região com menores temperaturas (abaixo de 135 °C) caso a concentração de ácido fosfórico seja ampliada a partir de 4,92% $v v^{-1}$. Ou seja, a combinação dessas duas variáveis é significativa para o modelo construído, indicando que o aumento ou decréscimo concomitante das duas variáveis gera efeitos negativos (por gerar condições demasiadamente severas ou brandas, respectivamente), e a combinação adequada entre as mesmas é que proporciona uma melhor condição hidrolítica. Tende-se, então, a optar-se por faixas de menores temperaturas (e conseqüente pressão) visto exigirem menores implicações técnicas ao processo, ou seja, opta-se por elevar o custo do processo quanto ao custo de reagentes (já que a quantidade de ácido utilizada é superior) pois entende-se que esta opção é ainda menos custosa que a ampliação da temperatura e pressão do processo.

A Figura 19 demonstra que as faixas ótimas referente às concentrações de ácidos empregadas foram de 1,44-3,76% ($v v^{-1}$) para HNO_3 , contudo, para a variável tempo o perfil experimental obtido indica que o ponto central não oferece as melhores condições, que são obtidas apenas nos pontos axiais (extremos) inferiores do planejamento multivariado empregado (em cerca de 28 min). Isso gera implicações na compreensão do modelo, visto que tal comportamento parece indicar que esta variável não apresenta caráter significativo se comparado à magnitude da concentração ácida, o que corrobora novamente o perfil descrito pelos diagramas de Pareto, onde a variável tempo não obteve significância estatística.

Em se tratando da combinação entre temperatura e concentração ácida, o perfil obtido se distingue um pouco daquele discutido na parágrafo anterior, justamente por indicar que os melhores resultados (maior liberação de açúcares fermentescíveis) situam-se nas regiões extremas de temperatura (acima de 155 °C e abaixo de 135 °C). A mais clara indicação obtida por esse resultado é que a variável temperatura, apesar de influenciar na produtividade dos açúcares, não possui a mesma significância da concentração ácida, sendo esta variável a preponderante no modelo estatístico. Assim, para o estudo envolvendo HNO_3 , pode-se operar em menores temperaturas (que acarretam menores pressões) sem perda de produtividade na hidrólise. Isto é corroborado pelo diagrama de Pareto descrito anteriormente, onde apenas os modelos estatísticos referentes a concentração de ácido nítrico foram relevantes.

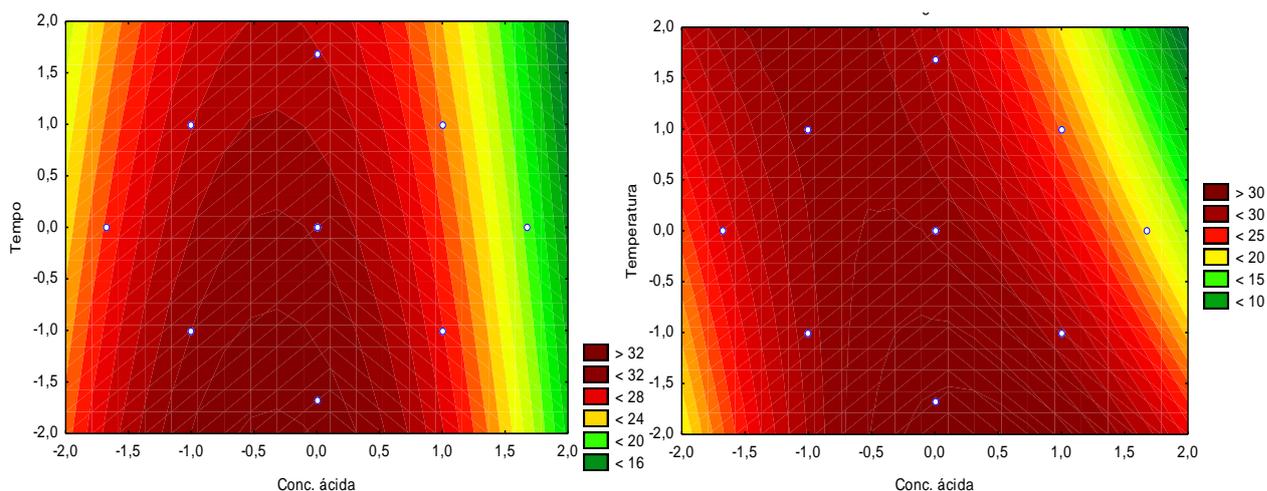


Figura 19 – Curvas de contorno para a concentração de xilose (g L^{-1}) envolvendo tratamentos com HNO_3 em função do tempo x concentração de ácido e temperatura x concentração de ácido.

Os resultados, tanto para os tratamentos com H_3PO_4 quanto para os tratamentos com HNO_3 , se apresentam assim bastante satisfatórios em relação à obtenção de um modelo estatístico que explique o processo de liberação de açúcares por meio da hidrólise ácida à pressão, e também por oferecer tal compreensão tendo atingido uma elevada liberação de açúcares a partir da CA.

No entanto, para o processo posterior de fermentação optou-se por empregar o hidrolisado oriundo de uma condição anteriormente conhecida pelo grupo de pesquisa do LATER (MONTIPÓ, 2012), visto ser este planejamento prévio referência nesta etapa unitária de investigação, bem como por não estarem disponíveis os dados referentes ao processo de otimização das hidrólises, discutidos até aqui, quando do início dos processos fermentativos. Devido à comprovada eficiência no uso do referido meio na etapa fermentativa, obteve-se uma condição inicial de trabalho mais apropriada, sem eliminar a necessidade de investigar a condição, obtida com este planejamento, como meio fermentativo em trabalhos futuros.

Ademais, a opção pela condição do hidrolisado de $0,82\% \text{ v v}^{-1}$ de HCl , 46 min de ensaio, em $145 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura (rendimento de $106,6 \text{ mg glicose g}^{-1} \text{ CA}$ e $88,2 \text{ mg xilose g}^{-1} \text{ CA}$), se deu também por esta condição ter sido obtida enquanto o laboratório não possuía os meios analíticos de quantificação dos açúcares liberados da CA (glicose, xilose e arabinose), mas apenas da glicose, sendo que a referida condição é a mais branda (menor carga de compostos tóxicos) dentre os ensaios efetuados, o que favorece o cultivo fúngico pretendido neste trabalho.

De fato, os resultados obtidos nos planejamentos estatísticos foram promissores e, via de regra, podem ser avaliados enquanto substratos fermentativos. Dentre os critérios a serem considerados no momento de se fazer essa escolha devem estar o próprio montante de açúcares liberados, mas também a quantidade de compostos possivelmente tóxicos produzidos na etapa hidrolítica, assim como as necessidades específicas de cada micro-organismo, fungo ou bactéria, por algum elemento ou composto. Assim sendo, para a fermentação com *A. terreus* por exemplo, sabe-se que condições limitadas de fósforo são necessárias para que o metabolismo fúngico seja direcionado para a produção de AI, ao invés de priorizar o crescimento do micélio fúngico (JUY, OREJAS & LUCCA, 2010). Assim sendo, o emprego de hidrolisado de ácido fosfórico deve ser criteriosamente avaliado visto a provável existência de alta quantidade de fósforo no meio, o que indicaria, nesse exemplo, que o hidrolisado obtido com ácido nítrico pode ser preferencial e gerar melhores resultados.

Outro aspecto a ser considerado é que, como o ácido nítrico possui em sua molécula átomos de nitrogênio, o mesmo pode servir de fonte do referido elemento para o micro-organismo que se deseja utilizar no processo fermentativo. Caso isso pudesse ser confirmado, por exemplo, o HNO_3 seria o agente ácido para hidrólise e, ao mesmo tempo, a fonte de nitrogênio para o meio. Isso diminui custos, consumo de reagentes e simplifica as etapas/exigências do processo.

4.2.2 Análise dos produtos de interesse e subprodutos

Os sacarídeos provenientes da CA, oriundos da degradação da matriz lignocelulósica, são glicose, xilose e arabinose, sendo que o primeiro provém da fração celulósica enquanto as demais são devidas à fração hemicelulósica da CA. Os três sacarídeos foram quantificados, visto o processo fermentativo contar com um fungo (*A. Terreus*) capaz de degradar não somente glicose. Ademais, sabendo-se da possibilidade de produção de alguns subprodutos da hidrólise, como ácidos acético e fórmico, bem como 5-HMF, de caráter tóxico ao fungo, os mesmos foram determinados e quantificados. Os resultados obtidos do planejamento multivariado

para os processos de hidrólise à pressão, empregando H_3PO_4 e HNO_3 , estão então descritos na Figura 20.

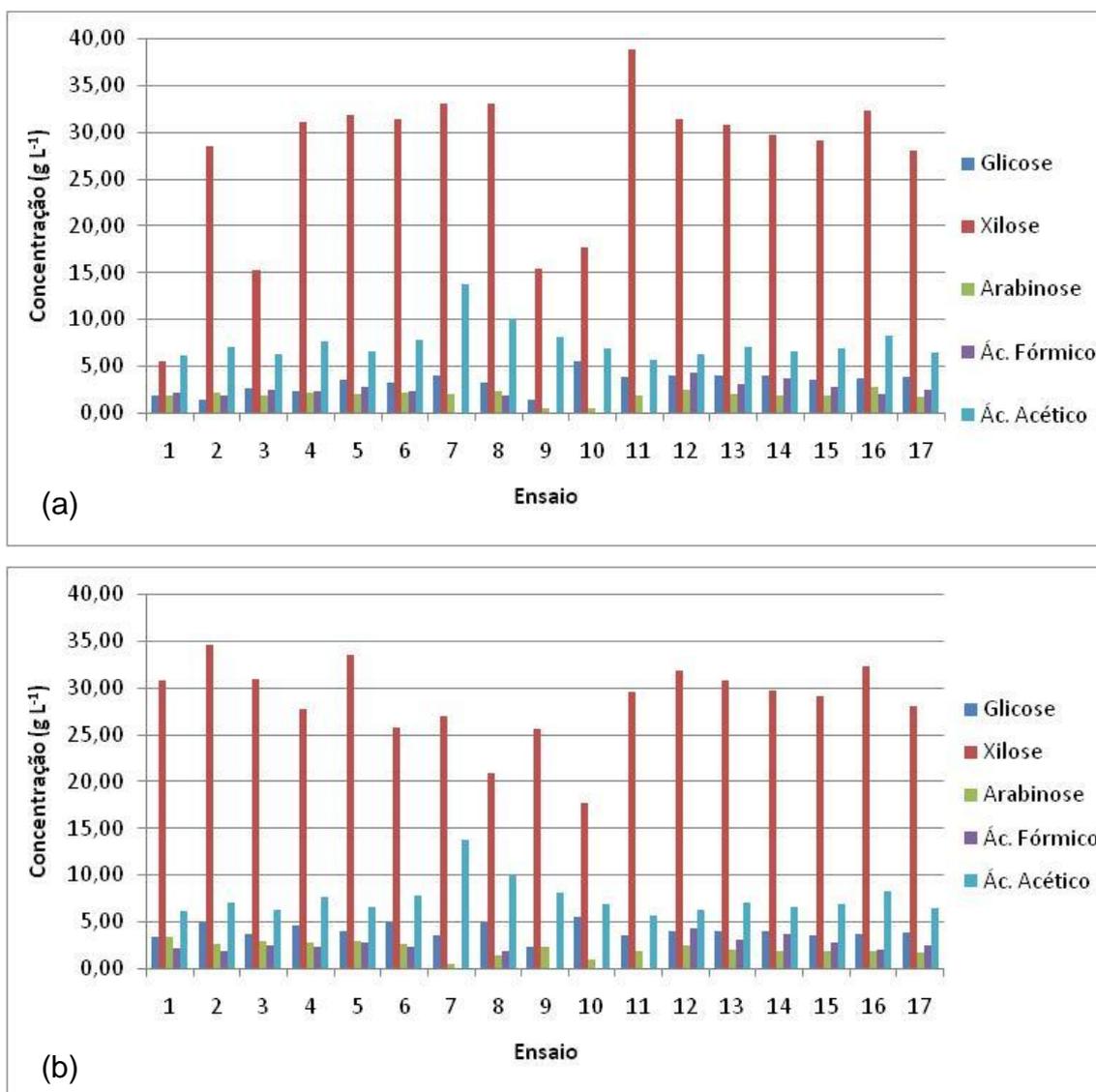


Figura 20 – Concentração média dos produtos de interesse e subprodutos formados durante o processo hidrolítico empregando-se H_3PO_4 (a) e HNO_3 (b) conforme as condições do planejamento experimental.

Através dessa figura percebe-se nitidamente que a xilose foi o sacarídeo com os melhores índices de produção pelo processo hidrolítico, independentemente do ácido adotado para o processo, sendo que seu rendimento foi várias vezes maior do que aquele obtido para a glicose, que foi o segundo sacarídeo de maior produção. A liberação de xilose ficou entre 5,4 – 38,9 g L⁻¹ (correspondendo a até 23,3% de

rendimento teórico), a liberação de glicose em $1,3 - 5,4 \text{ g L}^{-1}$ (correspondendo a até 3,2% de rendimento teórico), enquanto a arabinose ficou entre $0,4 - 2,8 \text{ g L}^{-1}$ (chegando a até 1,78% de rendimento teórico), quando empregou-se o ácido fosfórico; e de $17,7 - 34,6 \text{ g L}^{-1}$ (atingindo até 20,7% de rendimento teórico) para xilose, entre $2,3 - 5,4 \text{ g L}^{-1}$ (atingindo até 3,2% de rendimento teórico) para glicose, e $0,4 - 3,4 \text{ g L}^{-1}$ (correspondendo a 2,0% de rendimento teórico) arabinose, quando fez-se uso do HNO_3 .

Em suma, o intervalo ideal para a produção de xilose ocorreu quando as condições foram mais brandas (ou, então, quando houve um equilíbrio entre as variáveis de forma a não extremar as condições de processo), enquanto a glicose obteve maiores rendimentos quando o processo se deu em condições mais severas (principalmente a concentração ácida, independentemente da natureza do ácido utilizado), tendo a arabinose se comportado de forma diversa aos outros sacarídeos, já que apesar de ter sido produzida em pequena escala, o ácido nítrico se mostrou mais contundente na sua produção, enquanto o ácido fosfórico não parece afetar tanto a produção deste sacarídeo quanto as variáveis tempo e temperatura.

O mesmo raciocínio pode ser descrito para o trabalho de Bevilaqua (2013), que empregando os ácidos clorídrico e sulfúrico, e definindo seu fator resposta como o rendimento de glicose, obteve resultados inferiores aos conseguidos com os dois ácidos propostos neste trabalho. Isso indica que, apesar de estarem consolidados mundialmente e serem os mais amplamente utilizados para os processos hidrolíticos, tanto HCl quanto H_2SO_4 podem não ser as melhores plataformas para a liberação de açúcares fermentescíveis a partir da CA.

Dentre as reações químicas que ocorrem durante o processo hidrolítico, o montante de prótons (concentração ácida do sistema) tem uma função primordial. Mesmo que não houvesse a adição de ácidos ao sistema, e o mesmo fosse submetido apenas à ação da pressão, haveria aumento da acidez do meio devido a liberação de ácidos orgânicos endógenos, principalmente acético e fórmico, bem como pela protonação decorrente da dissociação da água (MOSIER *et al*, 2005).

Justamente por saber que ambos os ácidos citados são eventualmente produzidos no processo, os mesmos foram monitorados e quantificados, sendo que os ensaios dos distintos ácidos tiveram resultados semelhantes quanto a produtividade de ácido fórmico (entre $0 - 4,3 \text{ g L}^{-1}$) e ácido acético (entre $5,68 - 13,79 \text{ g L}^{-1}$) obtidos justamente quando as variáveis tempo e temperatura (esta em

menor escala) atingiram níveis mais severos, e não tanto relacionados à carga ácida adicionada ao sistema. Esse resultado é expressivo se considerado que uma concentração igual ou superior a $3,0 \text{ g L}^{-1}$ é considerada tóxica para qualquer micro-organismo (HELLE *et al*, 2003).

Outro inibidor do processo fermentativo, o 5HMF que igualmente foi monitorado, não foi identificado em nenhum ensaio experimental, indicando que o emprego dos ácidos fosfórico e nítrico não tendem a levar à sua produção, ao menos nas condições adotadas. Sua escolha como composto a ser monitorado é devido à compreensão de que temperaturas elevadas levam os sacarídeos oriundos da hidrólise ácida, principalmente da hemicelulose, a se degradarem e originar compostos derivados do furano: tanto o furfural (a partir da degradação das pentoses) como o 5-HMF (formado a partir da degradação das hexoses). Ainda deve se levar em consideração que, conforme Antunes *et al* (2010), ambos os compostos são capazes de se degradarem a outros produtos: o furfural pode originar ácido fórmico ou, então, se polimerizar, já o 5-HMF origina quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico.

Tendo o propósito de aumentar a fermentabilidade do meio hidrolisado, procedeu-se o estudo da avaliação de uma etapa de destoxificação que almeja eliminar parcial ou totalmente os compostos inibidores já descritos, sem que para isso seja reduzida a concentração de açúcares disponíveis para a fermentação. Além disto, a metodologia empregada deve ser de baixo custo e não causar efeito negativo ao ambiente.

Com objetivo semelhante ao aqui apresentado, porém empregando o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* para a fermentação láctica a partir de CA, Montipó (2012) empregou a adsorção através de carvão ativo (ou carvão vegetal) como técnica efetiva, visto ter obtido a redução da carga de 5-HMF à metade, e uma sensível diminuição dos ácidos fórmico e acético, permitindo aumento da fermentabilidade do meio hidrolisado. Esta abordagem bem sucedida foi, então, comparada com a adição de CaO, descrita na seção 3.2.3, e que objetivou atingir os mesmos resultados (ou melhores) eliminando a etapa posterior de ajuste do pH (visto a adição de óxido de cálcio proporcionar o aumento progressivo do mesmo).

O CaO foi escolhido visto sua capacidade de formação de substâncias precipitáveis com compostos como ácidos fórmico e acético, o que leva à formação de compostos como formiato de cálcio (bactericida) e acetato de cálcio (pouco

solúvel em água), que são prontamente retirados do meio por simples filtração, visto formarem aglomerados no fundo do recipiente. Uma metodologia similar e já bastante disseminada diz respeito ao uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como agente destoxicante, justamente por interagir e precipitar com os compostos inibidores (HUANG *et al*, 2008). Contudo, não há relatos de trabalho envolvendo sua aplicação sobre hidrolisados de CA.

Um ensaio fermentativo foi executado empregando-se hidrolisado com HCl, concentração ácida de 0,8 % (v v^{-1}), temperatura de 145 °C e 46 min como tempo de hidrólise, visando avaliar o tratamento de destoxificação mais apropriado, sendo que o parâmetro adotado para esta avaliação foi o consumo de glicose (Figura 21).

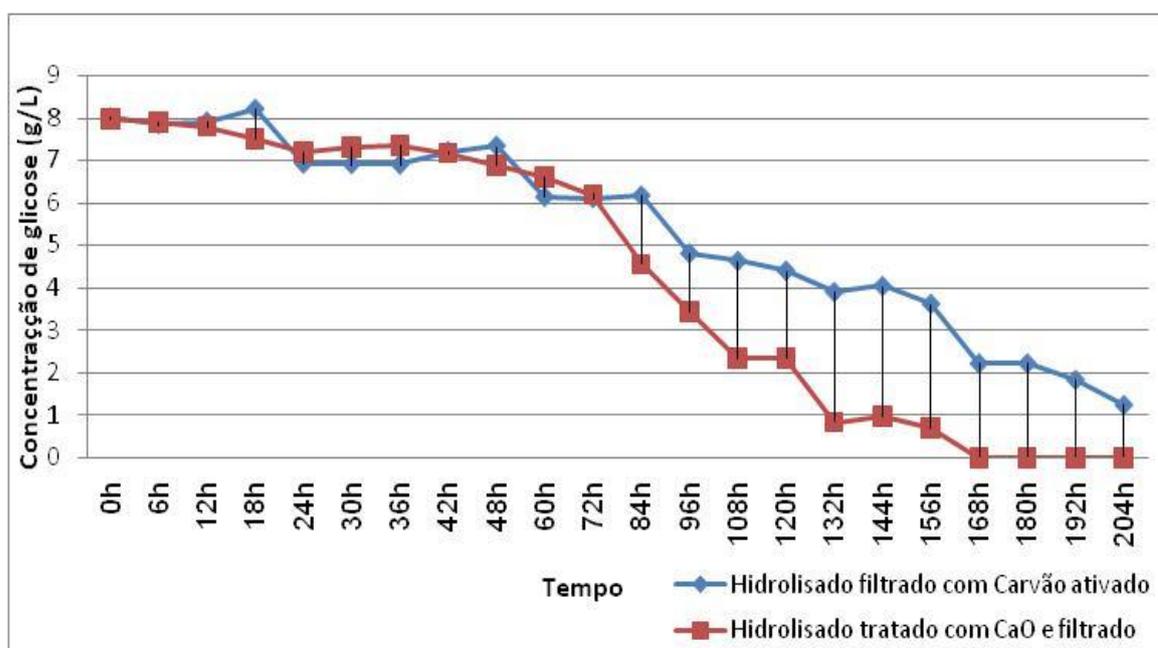


Figura 21 – Avaliação da etapa de destoxificação do hidrolisado de CA através de processo fermentativo com *A. terreus*.

Como pode ser verificado, as alíquotas iniciais foram recolhidas a cada 6 h até o tempo de 48 h, sendo então retiradas a cada 12 h, e demonstram que o hidrolisado destoxicado com CaO consiste em meio mais suscetível à fermentação com *A. terreus* em hidrolisado de CA visto ter atingido, em 168 h, o consumo total de glicose, enquanto o outro tratamento não apresentou consumo de glicose na mesma proporção, e nem mesmo ter alcançado o consumo total após 204 h de acompanhamento de processo. Mesmo a alíquota de 120 h já indica que a

concentração de glicose no meio situa-se em apenas 2,3 g L⁻¹ (ou seja, restando apenas 30% do montante inicial), enquanto o outro tratamento, na mesma alíquota, apresentou glicose residual de 4,39 g L⁻¹ (o que representa ainda 55% da concentração inicial). Ainda, vale notar que, ao fim das 204 h de monitoramento, o ensaio que utilizou carvão ativado para a destoxificação do meio de cultivo ainda apresentava glicose residual, enquanto seu equivalente havia exaurido esse recurso em 168 h de processo.

O emprego desta etapa unitária (adição de CaO, agitação/aquecimento, e filtração) permitiu reduzir, posteriormente, a carga de compostos inibidores nos meios fermentados avaliados pelo planejamento estatístico multivariado. Todos os ensaios passaram a adotar esta etapa e os compostos, ácido fórmico, acético e 5-HMF foram permanentemente monitorados durante o estudo fermentativo, sendo que em nenhum dos ensaios e planejamentos executados foram identificados, o que indica sua ausência ou ao menos sua existência no meio em concentrações abaixo do limite de detecção, o que implica na afirmação segura de não afetarem (inibirem) o micro-organismo no sistema fermentativo.

4.3 Fermentação do hidrolisado da casca de arroz

4.3.1 Determinação analítica dos produtos e subprodutos

A Figura 22 apresenta cromatogramas típicos provenientes das análises das soluções contendo apenas hidrolisado/fermentado da CA (solução usada como branco), soluções padrões de ácido itacônico, e dos açúcares glicose, xilose e arabinose (1,0 g L⁻¹) via HPLC-RID, e análises das alíquotas do processo fermentativo, ilustrando o crescimento do pico de AI de forma simultânea ao consumo dos açúcares presentes. Através destes cromatogramas é possível atestar-se o pico negativo referente à fase móvel (em tempo de retenção constante e sem gerar interferências) e a razoável resolução entre os picos cromatográficos, sendo o perfil de cada pico sem graves problemas de efeito de cauda e, igualmente, verifica-se a constância da linha base.

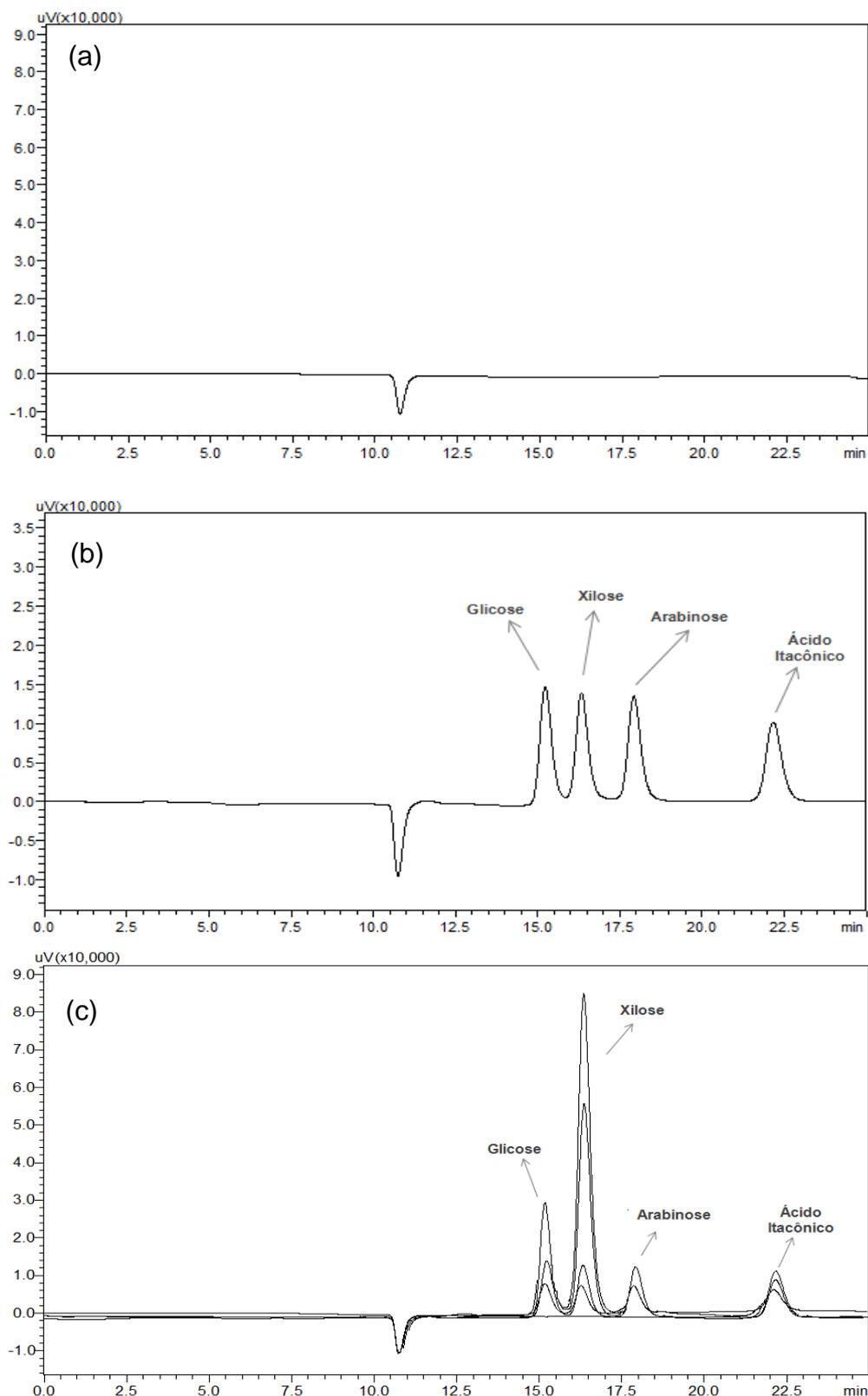


Figura 22 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de amostra em branco (a), de soluções-padrões (1 g L^{-1}) de ácido itacônico e açúcares glicose, xilose e arabinose (b), e do monitoramento da fermentação com produção de AI no meio, em sistema HPLC-RID (c).

4.3.2 Detecção do ácido itacônico por LC-MS/QqQ

O cromatograma obtido para os meios fermentados, empregando os hidrolisados de CA com HCl (0,8 % v v⁻¹), e detectado por meio de analisador de massas triplo quadrupolo, pode ser visualizado na Figura 23. Nela é possível verificar o pico referente ao AI, correspondendo às quatro transições (m/z) monitoradas devido à fragmentação da molécula ionizada de AI, e que correspondem às transições entre 131>73, 131>99, 133>73 e 133>101, em concentração na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$.

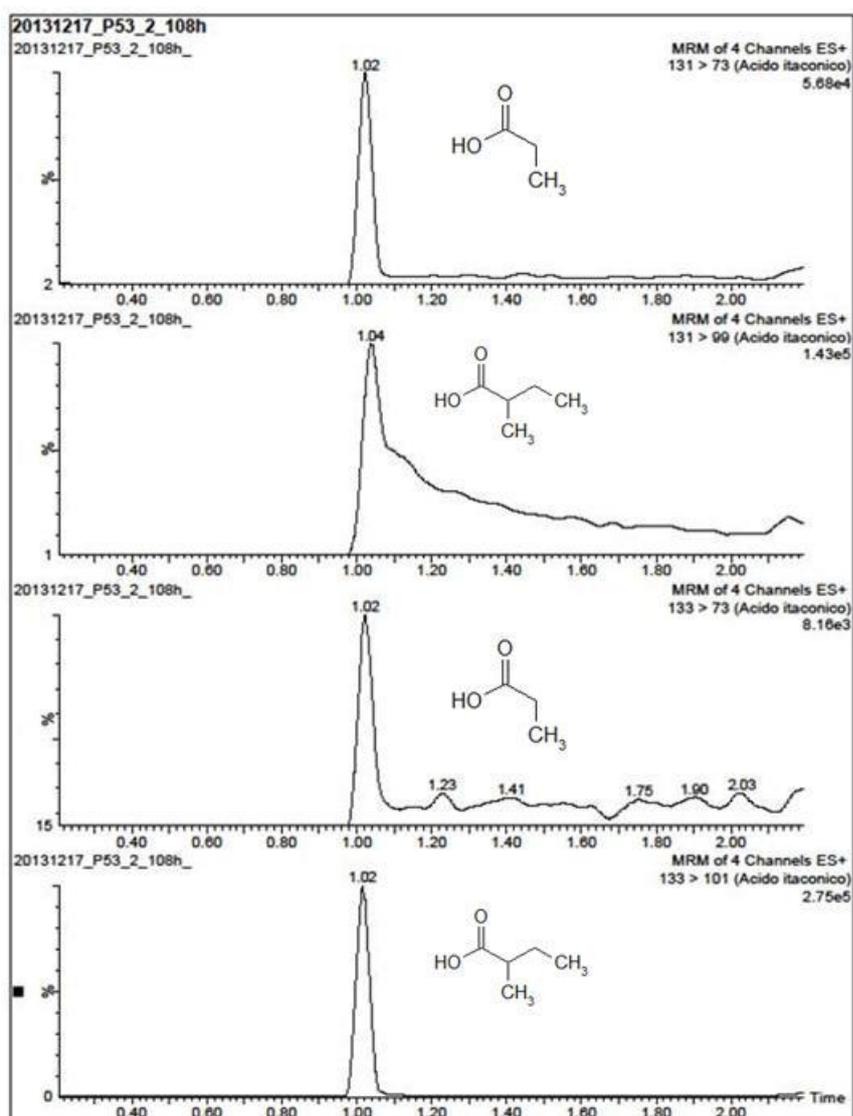


Figura 23 – Cromatograma em modo MRM de soluções padrão de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ via UHPLC-MS/MS.

As injeções de padrões e amostras permitiram identificar, em ambos os casos, concentrações de Al na faixa de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que permitiu operar confortavelmente sobre todas as soluções, mesmo aquelas em que a concentração de Al estava abaixo da faixa de detecção do sistema HPLC-RID. Assim, essa sensibilidade obtida via espectrometria de massas permitiu analisar, com boa confiabilidade analítica, as amostras do processo fermentativo.

4.3.3 Otimização da produção de ácido itacônico

Segundo dados prévios de autores que trabalharam com o fungo *A. terreus*, descritos na seção 2.3.2., as condições fermentativas deste fungo são requisitos fundamentais a serem seguidos. Existem relatos de estudos de processos fermentativos em que pode ser almejado (de forma proposital ou acidental) o crescimento fúngico em detrimento do aumento do funcionamento do metabolismo fúngico relacionado à produção de algum composto de interesse (JUY, OREJAS & LUCCA, 2010).

Muitos parâmetros precisam ser previstos e otimizados em busca de rendimentos satisfatórios, como nos diz Lakshmi *et al* (2009), não apenas a condição aeróbia precisa ser garantida, itens como (I) temperatura e (II) tempo de incubação, (III) composição do meio (carga inicial de açúcares e inibidores), (IV) pH inicial, (V) tamanho da partícula de biomassa, (VI) concentração do inóculo fúngico e outros particulares de cada micro-organismo.

Tendo-se em vista a utilização pioneira de hidrolisado de CA como substrato fermentativo fúngico, e antes do emprego de ferramentas estatística multivariadas visando a otimização deste meio, se fez necessária a execução de alguns testes fermentativos prévios (descritos no apêndice A), que possibilitaram avaliar a atividade fúngica, sua resposta inicial ao substrato hidrolisado, bem como verificar quais variáveis deveriam efetivamente ser avaliadas no planejamento estatístico a ser aplicado.

A primeira e relevante conclusão conseguida foi em relação aos requisitos nutricionais fúngicos, extremamente complexos e que, por este motivo, requeriam a suplementação do meio hidrolisado proposto. Assim, e visando sempre a

simplificação das práticas e etapas, propôs-se de forma bem sucedida a adição de meio BDA, bastante simples e que auxilia na complementação nutricional do meio, proposta essa embasada nos resultados do referido apêndice.

Esta adição de BDA, somada às condições obtidas pelos estudos prévios, permitiu atingir condições propícias ao crescimento de *A. terreus* no meio em estudo, também definindo as variáveis tempo e temperatura como fundamentais ao processo, assim como o pH inicial e a fonte de nitrogênio. Em adição a essas variáveis, adicionou-se a avaliação da origem da CA, a fim de verificar sua relevância ao processo fermentativo.

Para tanto, concebeu-se um delineamento experimental para avaliar as variáveis importantes no processo de fermentação fúngica. Em função de limitações físicas e de equipamento, o planejamento foi concebido em blocos, onde a variável definida para cada um dos três blocos foi a temperatura, e então a análise de cada etapa estatística a ser feita individualmente. Dessa forma, com a execução do primeiro bloco, e sua posterior interpretação de resultados, a possível eliminação/alteração de variáveis para os blocos restantes.

As variáveis em análise foram, então, a temperatura (26 – 34 °C), pH inicial (4,5 – 6,5), origem da CA (parboilizado ou não-parboilizado) e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (0 – 10,0 g L⁻¹). O fator resposta concebido para o planejamento (em todos os blocos), por limitação analítica da disponibilidade do HPLC-RID para esta etapa do trabalho, foi o consumo de glicose (relacionada com o crescimento fúngico e produção de AI) então determinada pela metodologia espectrofotométrica, descrita na seção 3.5.2.

A Tabela 17 expõe os valores codificados dos ensaios experimentais, ressaltando-se que alíquotas foram retiradas a cada 12 h, sendo que o tempo utilizado para a avaliação estatística foi definido como sendo aquele que corresponde ao tempo necessário para que o primeiro dentre os ensaios monitorados tenha chegado a 100% (ou tendido, de forma infinita, a isso) de consumo de glicose.

O planejamento descrito neste primeiro bloco foi executado em estufa a 30 °C, sempre mantendo a proporção entre tamanho (capacidade) dos frascos e volume de meio em 5:1, contando com adição de 1:1 de meio BDA empregando substrato hidrolisado (HCl a 0,8% v v⁻¹, 145 °C por 46 min.). As variáveis independentes foram analisadas da seguinte forma: pH entre 4,5 e 6,5, origem de

CA definida como 0 – 100% provinda de processo parboilizado, e extrato de levedura de 0 – 10,0 g L⁻¹, sendo executado apenas um ensaio no ponto central, o que totalizou nove ensaios.

Tabela 17 – Resultados do delineamento experimental fatorial (sem pontos axiais), visando o consumo de glicose como fator resposta, a 168 h.

Ensaio	pH	Origem CA	Ext. Levedura	Espectrofotometria ($\lambda=505$ nm)		
				C _I -Glicose (g L ⁻¹)	C _F -Glicose (g L ⁻¹)	Consumo (%)
1	-1	1	-1	7,1	3,7	46,8
2	-1	1	1	7,2	1,7	76,1
3	-1	-1	-1	6,6	0,7	89,5
4	-1	-1	1	7,0	0,4	93,6
5	1	1	-1	6,3	1,1	81,9
6	1	1	1	7,3	0,5	93,4
7	1	-1	-1	7,5	8,7	16,8
8	1	-1	1	8,0	0,5	93,2
9	0	0	0	7,3	0,4	93,8

Desvio padrão = $\pm 0,45$ (g L⁻¹)

A Figura 24 ilustra a cinética do processo fermentativo referente ao primeiro bloco, a 30 °C, para os nove ensaios experimentais, entre 0 – 204 h (alíquotas a cada 12 h). É possível verificar, em concordância com a Tabela 18 para 168 h de processo, que apenas os ensaios 1 (pH em 5,0, com CA parboilizado e sem EL) e ensaio 7 (pH em 6,0, com CA não-parboilizado e sem EL), ambos sem utilização de EL, apresentaram baixo consumo de glicose (concentração remanescente de glicose acima de 3,0 g L⁻¹), o que indica ser essa variável relevante no processo, assim como a variação de pH apresentar interferência no processo (tendendo, de forma positiva, para a faixa de pH 5,0).

Os melhores resultados ficaram a cargo dos ensaios 4 (pH em 5,0, com CA não-parboilizado e com 10,0 g L⁻¹ de EL), ensaio 8 (pH em 6,0, com CA não-parboilizado e com 10,0 g L⁻¹ de EL) e ensaio 9 (pH em 5,5, com 1:1 de CA parboilizada e não-parboilizada e com 5,0 g L⁻¹ de EL), todos utilizando ao menos 5,0 g L⁻¹ de EL.

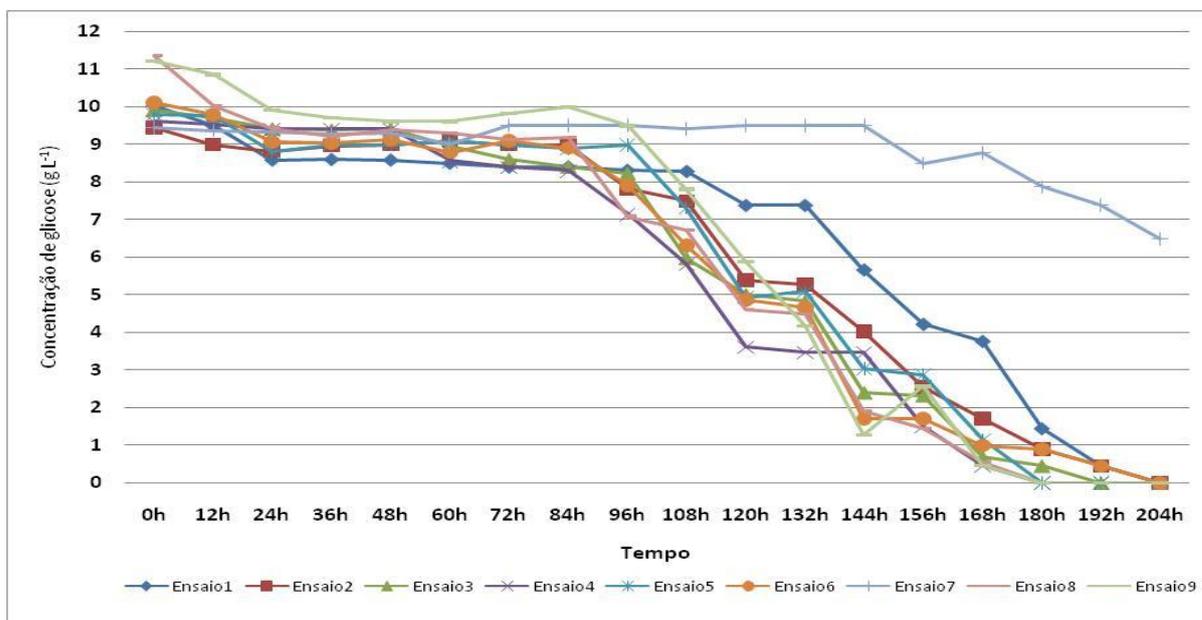


Figura 24 – Cinética do processo fermentativo, a 30 °C, evidenciando o consumo de glicose x tempo de fermentação.

Ademais, o perfil inicial obtido até 96 h é característico do fungo (adaptação ao meio e início do seu crescimento/ativação metabólica), o que resulta na ausência de consumo apreciável de glicose. Isso indica, ainda, o quão importante é a escolha do tempo a ser analisado como resultado para o fator resposta no delineamento estatístico.

Posteriormente, a matriz contida na Tabela 18 foi processada com auxílio do *software* Statistica 8.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 90% ($p < 0,1$). A análise do diagrama de Pareto exposto na Figura 25 (a) nos mostra que entre as variáveis sob estudo e nos patamares definidos pelo experimento, não houve significância estatística mesmo empregando o nível de significância de 90% (inferior ao patamar de 95% que tenderia a restringir ainda mais o critério de significância para as variáveis).

No entanto, se o mesmo modelo estatístico for empregado ignorando os efeitos menos significativos em prol da variável independente relacionada ao EL e daquela referente a interação entre pH e origem de CA, passamos a visualizar o gráfico da Figura 25 (b), que demonstra a significância desses dois itens, o que nos permite formular a equação 13 do modelo, bem como construir os resultados da análise de variância (ANOVA) para o mesmo modelo (Tabela 18).

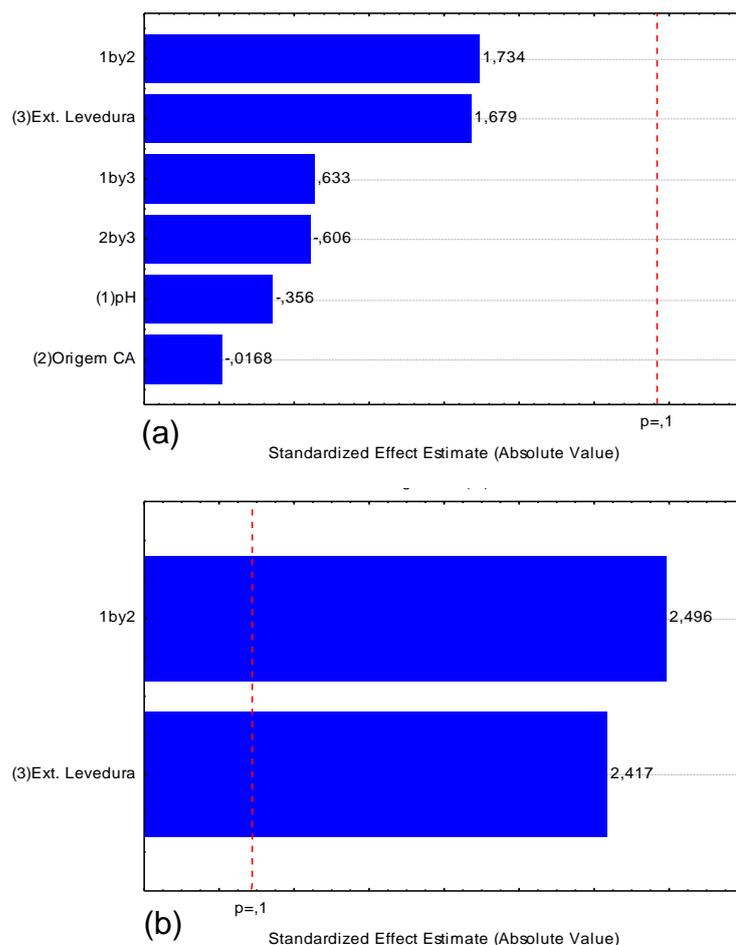


Figura 25 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento fatorial com três variáveis independentes, analisando o resultado do processo fermentativo em 168 h, com todos os efeitos (a) e apenas com os dois mais significativos (b).

Os valores de ANOVA demonstram o quanto os modelos são eficazes em descrever corretamente a resposta do consumo de glicose em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos indicando serem adequados. Os valores do r^2 asseguram que 67% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático, sendo que o F calculado foi significativo ($p < 0,1$), sendo quase quatro vezes superior ao valor de F tabelado para o referido montante de graus de liberdade.

$$Y = 77,546 + 16,485(\text{pH}) \times (\text{origem CA}) + 15,965(\text{extrato de levedura}) \quad (13)$$

Tabela 18 – Análise de variância para o processo fermentativo a 30 °C.

Fator Resposta	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Consumo de glicose	Regressão	4203	2	2101,5	12,07
	Resíduos	2093,3	6	348,883	
	Total	6296,3	8		

$r^2 = 67\%$, e $F_{2,6;0,1} = 4,45$;

Visando reduzir o número de ensaios para o segundo bloco (diminuição do consumo de reagentes, produção de resíduos, e por limitação de espaço dentro da estrutura do laboratório), a variável menos significativa do primeiro bloco do delineamento experimental (origem da CA) foi retirada do planejamento, considerando-a assim como não relevante estatisticamente para a melhoria do processo fermentativo. Com a redução dessa variável, o segundo e terceiro blocos, correspondendo respectivamente às temperaturas de 26 e 34 °C, puderam analisar apenas o efeito das duas variáveis (mais a variável em bloco) restantes e suas interações, recebendo então a adição de pontos axiais ao espaço amostral. Para esta etapa foi escolhido o delineamento composto central, não utilizando-se o ponto axial equivalente ao parâmetro estatístico denominado rotacional (ponto codificado como $\pm 1,68$), em prol de uma melhor análise do espaço amostral, ampliando este ponto axial para o valor codificado como $\pm 2,0$.

A proporção entre frasco e volume foi mantida em 5:1, utilizando o mesmo substrato hidrolisado (HCl a 0,8% v v⁻¹, 145 °C por 46 min.). As variáveis independentes foram analisadas da seguinte forma: pH entre 4,5 e 6,5 e extrato de levedura de 0 – 10,0 g L⁻¹, sendo executado apenas um ensaio no ponto central, totalizando nove ensaios para cada bloco (Tabela 19).

A Figura 26 (a) ilustra a cinética do processo fermentativo referente ao segundo bloco, a 26 °C, para os nove ensaios experimentais, entre 0 – 204 h, é possível verificar, em concordância com a Tabela 17 para 120 h de processo, que os piores resultados estão entre os ensaios 1, 3, 5 e 7 que possuem, com exceção do segundo citado, as menores concentrações de extrato de levedura (entre 0-5,0 g L⁻¹) e pH até 5,5. Esse perfil indica que o incremento de ambas as variáveis parece ser

relevante no processo. O melhor resultado foi obtido com o ensaio 8 (pH em 5,5 e extrato de levedura em 10,0 g L⁻¹) obtendo 100% de consumo de glicose.

Tabela 19 – Resultados do delineamento experimental, para três variáveis, visando o consumo de glicose como fator resposta, a 120 h para 2ºbloco e 96 h para o 3ºbloco (Desvio padrão = ± 0,45 g L⁻¹)

	Ensaio	pH	Ext. Levedura	Espectrofotometria ($\lambda=505$ nm)		
				C _I -Glicose (g L ⁻¹)	C _F -Glicose (g L ⁻¹)	Consumo (%)
Segundo bloco (26 °C)	1	-1	-1	9,10	4,57	49,78
	2	1	-1	8,56	1,41	83,53
	3	-1	1	8,82	7,01	20,52
	4	1	1	9,49	1,26	86,72
	5	-2	0	9,32	5,36	42,49
	6	2	0	9,62	1,74	81,91
	7	0	-2	9,09	5,00	44,99
	8	0	2	10,47	0,00	100,00
	9	0	0	10,69	0,60	94,39
	Ensaio	pH	Ext. Levedura	Espectrofotometria ($\lambda=505$ nm)		
				C _I -Glicose (g L ⁻¹)	C _F -Glicose (g L ⁻¹)	Consumo (%)
Terceiro bloco (34 °C)	1	-1	-1	8,08	3,56	44,18
	2	1	-1	8,60	1,27	85,20
	3	-1	1	8,87	5,27	40,58
	4	1	1	8,65	1,36	84,22
	5	-2	0	9,02	2,68	70,28
	6	2	0	8,99	0,00	100,00
	7	0	-2	9,30	6,72	27,74
	8	0	2	8,80	0,45	94,88
	9	0	0	8,67	0,85	90,19

Ademais, o perfil inicial obtido até 48 h é característico do período de adaptação do fungo ao meio e início de seu crescimento/ativação metabólica, o que resulta na ausência de consumo apreciável de glicose. Contudo, ao contrário do comportamento verificado quando da execução da fermentação a 30 °C, o período foi bem menor, sendo apenas metade do primeiro, o que indica que a menor

temperatura favorece a etapa de adaptação fúngica ao meio, dentro do espaço amostral analisado.

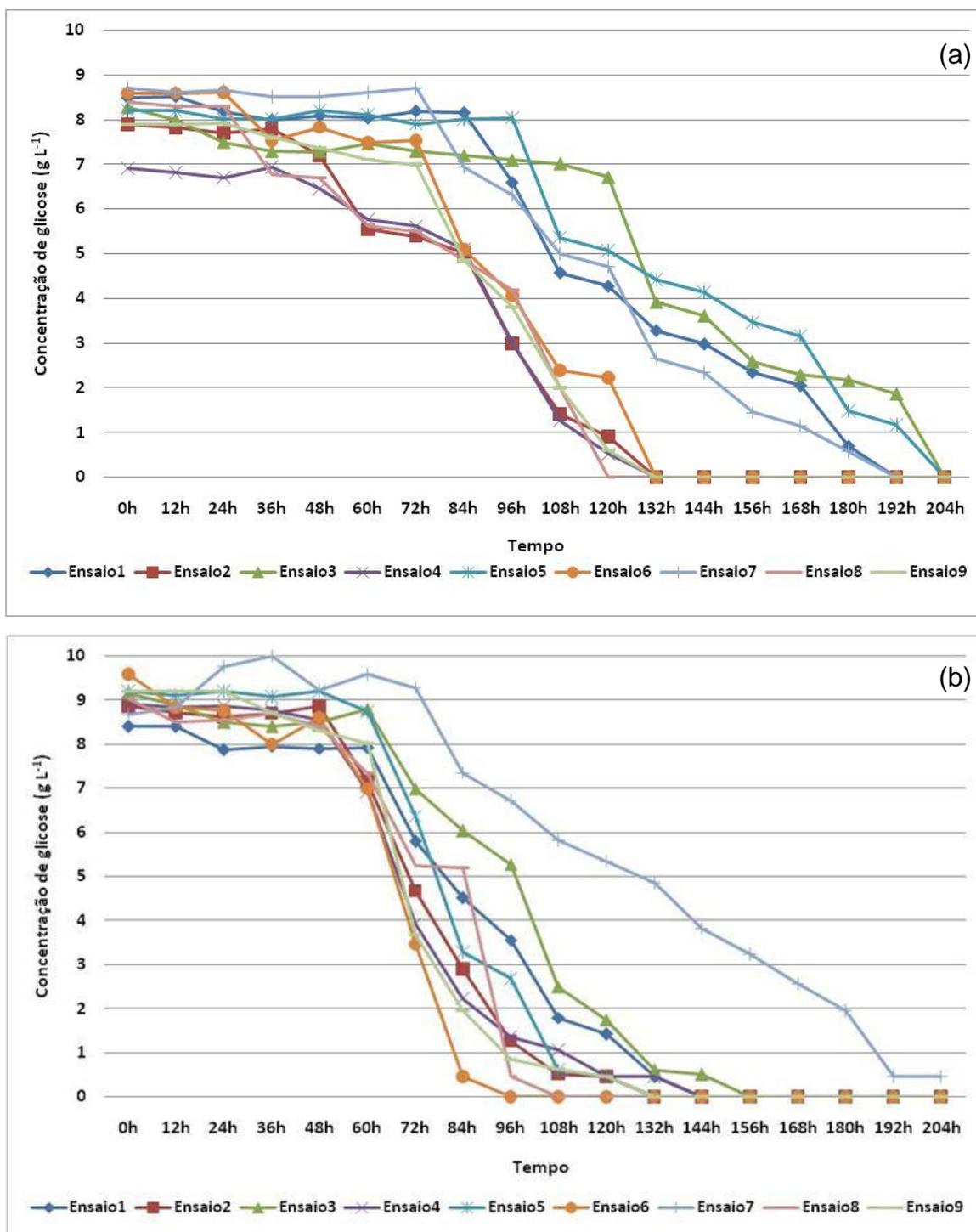


Figura 26 – Cinética do processo fermentativo, a 26 °C (a) e a 34 °C (b), evidenciando o consumo de glicose x tempo de fermentação.

Em se tratando da Figura 26 (b), ilustra-se a cinética do processo fermentativo referente ao terceiro bloco, a 34 °C, para os nove ensaios experimentais, entre 0 – 204 h, sendo possível verificar, em concordância com a Tabela 17 para 96 h de processo, que os melhores resultados estão entre os ensaios 6 e 8 (respectivamente 100 e 94,88% de consumo de glicose) que compreendem os pontos axiais do delineamento experimental para pH e EL, respectivamente. Os demais ensaios obtiveram, iniciando pelo ponto central, progressivamente menor consumo de glicose

Visualiza-se facilmente como o perfil inicial obtido até 48 h, de desprezível consumo de glicose, é praticamente o mesmo verificado para o bloco experimental realizado a 26 °C (8 °C a menos). Esse comportamento indica que a variável colocada em bloco, a temperatura, interage com as demais variáveis independentes e essa interação é relevante para a otimização do processo fermentativo, afinal a 30 °C (ponto médio) o período de adaptação fúngica foi bem maior, porém, coincidiu com a ausência do planejamento dotado dos pontos axiais para as variáveis pH e EL.

Com o apoio do *software* Statistica 8.0, a matriz contida na Tabela 17 foi processada e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 90% ($p < 0,1$). A análise do diagrama de Pareto exposto na Figura 27 (referente ao 2º e 3º blocos) nos permite perceber que, entre as variáveis sob estudo e nos patamares definidos pelo experimento, houve significância estatística tanto para a variável relacionada ao pH (em modelo linear), como para o extrato de levedura, também em modelo linear. Ambos os efeitos são positivos, o que indica que o aumento dos valores dessas variáveis independentes acarreta no aumento do consumo de glicose.

Em relação a temperatura, este parâmetro não foi considerado significativo estatisticamente para nenhum dos blocos do delineamento experimental e, apesar de saber-se que o fungo possui uma faixa ótima de temperatura para seu crescimento/metabolismo, pode-se considerar que qualquer temperatura dentro do espaço amostral estudado (26 – 34 °C) é válida para a fermentação fúngica. A equação 14 foi formulada a partir do modelo descrito. Utilizando-se os resultados obtidos foi possível desenvolver uma análise de variância (ANOVA) para o mesmo modelo (Tabela 20).

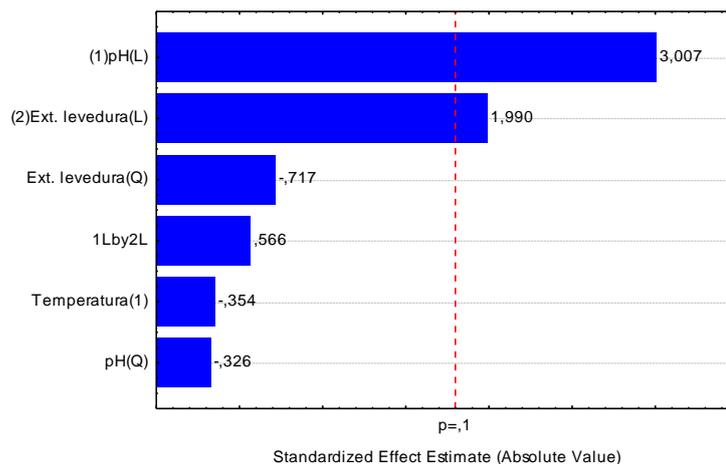


Figura 27 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento fatorial com duas variáveis independentes, analisando o resultado do processo fermentativo em 120 h para o 2º bloco e 96 h para o 3º bloco.

A ANOVA da referida tabela indica que o modelo matemático construído é capaz de descrever (com intervalo de confiança de 90%) corretamente a resposta do consumo de glicose em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, indicando serem adequados ($p < 0,1$). Os valores do r^2 asseguram que 56% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático construído, e o valor de F calculado foi significativo sendo mais de quatro vezes superior ao valor de F tabelado para o referido montante de graus de liberdade.

$$Y = 75,004 + 13,454(\text{pH}) + 8,902 (\text{extrato de levedura}) \quad (14)$$

Tabela 20 – Análise de variância para os processos fermentativos.

Fator Resposta	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Consumo de glicose	Regressão	6245,9	2	3122,95	13,00
	Resíduos	5734,8	15	382,32	
	Total	11980,7	17		

$$r^2 = 56\% \text{ e } F_{2, 15; 0,1} = 2,64$$

A representação gráfica das respostas, disposta na Figura 28, é relativa aos segundo e terceiro blocos do delineamento experimental da fermentação. De forma

sucinta é possível constatar-se que o maior consumo de glicose situa-se na região onde estão os pontos axiais de pH e extrato de levedura (decodificados no planejamento como +2,0), sendo a faixa de pH em 6,5 e extrato de levedura em 10,0 g L⁻¹.

No mesmo raciocínio, o ponto central não é o mais indicado por não representar os melhores resultados experimentais. E, por outro lado, apesar de os gráficos de contorno indicarem que um aumento dos patamares experimentais das variáveis independentes (pH e extrato de levedura) seja desejável (extrapolando o resultado na Figura 28), sabe-se por estudos prévios (não discutidos neste trabalho) que ao atingir-se a faixa de pH 7,0 a possibilidade de contaminação bacteriana do meio (indesejável) é aumentada abruptamente, e o ritmo de crescimento fúngico é desacelerado de forma acentuada. O mesmo sabe-se sobre a adição excessiva de extrato de levedura, que acima da concentração contemplada no estudo estatístico descrito neste trabalho começa a sofrer problemas de solubilização e a exercer efeitos negativos sobre o meio (inibição).

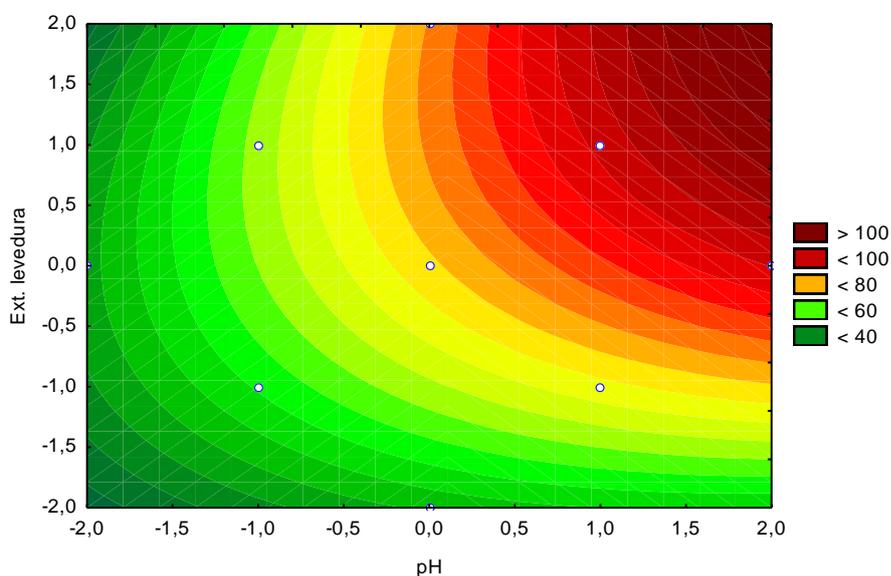


Figura 28 – Curva de contorno para o consumo de glicose (%) envolvendo os processos fermentativos a 26°C e 34°C.

Encerrando a discussão acerca do planejamento estatístico delineado para a fermentação, vale discorrer acerca dos valores obtidos para o coeficiente de determinação. Em suma, o valor de r^2 para os modelos aplicados ao estudo da

fermentação ficou em patamares aquém do esperado, entre 56 e 67%. Isto revela uma falta de enquadramento do resultado experimental com aquilo que seria esperado e poderia ser previsto pelo delineamento experimental, e isso constituiria uma grave falha nos resultados. Contudo, é necessário coerência e uma análise mais profunda sobre esses indicadores a fim de julgar corretamente os mesmos. Assim, deve-se levar em consideração que o processo de bioconversão aqui proposto envolve um micro-organismo suscetível a diversas outras variáveis que em maior ou menor grau, podem afetar seu desempenho (até mesmo aquelas oriundas do processo de inoculação do fungo e que podem afetar diretamente a fermentação). Ainda, a impossibilidade de realizar-se análises em duplicata (em virtude da limitação física do laboratório, as duplicatas foram feitas apenas para as análises, e não na amostragem) afeta a margem de erro dos resultados, que por sua vez se relaciona diretamente com o parâmetro descrito pelo valor de r^2 .

4.3.4 Acompanhamento da cinética da produção fermentativa de AI

Em posse dos resultados do delineamento experimental que indicaram a possibilidade de utilizar CA de ambos os beneficiamentos estudados, optou-se por adotar-se a CA parboilizada como matéria-prima para a hidrólise em virtude de sua maior disponibilidade (visto sua produção por indústrias nos arredores do laboratório de pesquisa). A temperatura, visto ter sido igualmente considerada como variável não significativa dentro do espaço amostral avaliado, foi fixada em 30 °C por ser o valor médio avaliado no presente trabalho.

As demais condições utilizadas, como a relação entre coluna de ar (tamanho do frasco) e meio fermentativo e a adição de meio BDA, foram mantidas constantes. Enquanto os parâmetros encontrados como sendo os responsáveis pelo incremento do consumo de glicose foram fixados nos patamares otimizados, respectivamente 6,0 para o pH e 10,0 g L⁻¹ para a concentração de extrato de levedura.

Contudo, durante o delineamento experimental descrito não foi possível determinar-se e acompanhar a produção de AI pelo fungo *A. terreus* que, por consequência do consumo de glicose, deveria estar sendo liberado progressivamente no meio. Esta ausência do analito no sistema gerou dúvidas

acerca das condições analíticas (e suas figuras de mérito) previamente estabelecidas, bem como sobre a cepa de *Aspergillus* utilizada no presente trabalho e foi justamente sanar essa questão que um novo ensaio fermentativo foi planejado.

Assim, uma matriz foi elaborada (Tabela 21) a fim de avaliar a cepa em utilização (por comparação com outro fungo provindo de isolamento clínico) e sua capacidade de excretar no meio extracelular o AI, bem como verificar se a ausência do analito nos cromatogramas (via HPLC-RID) era devido à faixa de trabalho utilizada ou se o meio otimizado do hidrolisado era o responsável por gerar o resultado descrito. Em caso positivo para este último item, considerar-se-ia que o meio não é próprio para ativar o metabolismo fúngico, e sim para gerar apenas o crescimento do mesmo às custas do consumo de açúcares.

A tabela evidencia que além do meio hidrolisado otimizado (ensaio 5 e 6) foi empregado um meio suplementado com glicose onde os patamares iniciais de concentração ficaram na faixa de 100 g L^{-1} (ensaio 1, 2 e 8), e um meio sintético (ensaio 3, 4 e 7) rico em glicose (única fonte de carbono) e composto de concentrações de metais e sais diversos necessários ao suprimento das necessidades nutricionais do *A. terreus* (JUY, OREJAS & LUCCA, 2010).

Tabela 21 – Fermentação comparativa entre cepas de *A. terreus*, substratos fermentativos e produção de AI, com o tempo e pH para cada processo.

Ensaio	Fungo	Meio	pH	Consumo Glicose (%)	Consumo Xilose (%)	Consumo Arabinose (%)	AI (g L^{-1})	Tempo (h)
1	ATCC7860	Suplementado c/ Glicose	4	14,60	3,11	100	0,41	72
2	ATCC7860	Suplementado c/ Glicose	6	70,91	23,64	100	1,34	144
3	ATCC7860	Meio Sintético	4	36,45	-	-	1,07	144
4	ATCC7860	Meio Sintético	6	42,91	-	-	0,83	156
5	Isolado Clínico	Hidrolisado	4	9,22	0,00	0	0,96	120
6	Isolado Clínico	Hidrolisado	6	0,00	0,00	0	0,76	156
7	Isolado Clínico	Meio Sintético	4	11,65	-	-	0,36	108
8	Isolado Clínico	Suplementado c/ Glicose	6	0,00	7,96	100	0,23	108

Meio sintético (g L^{-1}): glicose (100,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,01), KH_2PO_4 (0,2), NH_4NO_3 (5,0), Cl_2Ca (2,0), em pH 5,5.

A fermentação descrita na Tabela 19 foi acompanhada da mesma forma que as demais ocorridas anteriormente, com retirada de alíquotas a cada 12 h. Porém, além da determinação com HPLC-RID, um UHPLC-MS/MS equipado com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (pertencente ao LARP – Laboratório de Análise de Resíduos e Pesticidas, UFSM) foi usado para garantir os resultados provindos do cromatógrafo a líquido do LATER.

O desempenho das duas cepas foi pronunciadamente diferente, pois enquanto a cepa ATCC 7860 consumiu glicose em todos os ensaios em que foi utilizada, a outra cepa apresentou desempenho irrisório, e em dois casos (ensaio 6 e 8), o resultado ficou próximo a zero. O melhor resultado foi obtido com o ensaio 2, onde o meio hidrolisado otimizado ao longo deste trabalho foi propositalmente suplementado com glicose (o que o fez atingir a concentração inicial de $47,8 \text{ g L}^{-1}$) a fim de garantir abundância da fonte de carbono no meio, e o consumo de glicose atingiu 70,91% (decréscimo de $33,9 \text{ g L}^{-1}$), enquanto a xilose decaiu 23,64% (para apenas $4,0 \text{ g L}^{-1}$) e a arabinose, apesar de estar presente em baixa concentração ($0,7 \text{ g L}^{-1}$), foi consumida totalmente, tudo isso para 144 h de processo.

No mesmo ensaio que gerou o maior consumo de açúcares foi obtido a maior produção de AI, atingindo-se $1,3 \text{ g L}^{-1}$ do mesmo, em 144 h de fermentação. Valor ligeiramente superior aos demais ensaios onde foi verificada uma baixa liberação de AI no meio (entre $0,4 - 1,1 \text{ g L}^{-1}$), e mesmo nos ensaios envolvendo a cepa oriunda de isolamento clínico (entre $0,2 - 1,0 \text{ g L}^{-1}$).

Vale destacar que a diferença entre as condições experimentais entre os ensaios 1 e 2 foi apenas o pH inicial do meio, sendo que o pH 6,0 (ensaio 2) comprovou o resultado do delineamento estatístico prévio que apontou esta faixa de pH como sendo mais favorável em relação à patamares inferiores (em pH 4,0 o consumo de açúcares foi 73,8% inferior, e produção de AI foi 69,4% menor).

A cinética do processo fermentativo, para o ensaio 2 da matriz exposta na Tabela 21, pode ser visualizado através da Figura 29, que explicita o declínio de glicose em concomitância com a produção fúngica de AI, de forma mais pronunciada a partir de 108 h e atingindo seu ápice em 144 h de processo, a partir do qual se manteve basicamente constante. O ligeiro declínio notado para a concentração de AI, na parte final do processo, pode ser atribuído à sua conversão/reação no meio, visto ter sido verificada a sua estabilidade no meio fermentado, e havia sido

confirmada que não ocorriam variações nos 20 dias subsequentes à retirada da alíquota, e todas as análises foram feitas antes desse prazo.

O resultado deste ensaio fermentativo atestou a capacidade da cepa de *A. terreus* em produzir AI, indicando que o problema ocorrido durante o delineamento experimental na determinação do analito foi devido a duas possíveis causas: (I) a concentração de AI produzida estava abaixo do LD e LQ da técnica empregando HPLC-RID, e por isso, as diluições utilizadas deviam ser revistas, e (II) o meio hidrolisado, mesmo com a otimização visando o consumo de glicose, não é ideal para a produção de AI, e sim para o crescimento fúngico.

A forma encontrada para solucionar esta questão foi realizar uma nova etapa fermentativa utilizando o meio hidrolisado otimizado e sem suplementação de glicose (e comparar este ensaio ao mesmo executado e descrito na Tabela 19), ao mesmo tempo em que a diluição da alíquota do fermentado fosse diminuída.

Mantendo a abordagem já descrita em relação ao preparo do meio de cultivo, bem como em relação às condições otimizadas, o ensaio fermentativo foi executado em duplicata e monitorado até o tempo de 180 h, onde a partir disso tornou-se inviável a retirada de alíquotas visto da viscosidade do meio em virtude do crescimento do micélio fúngico (Figura 30).

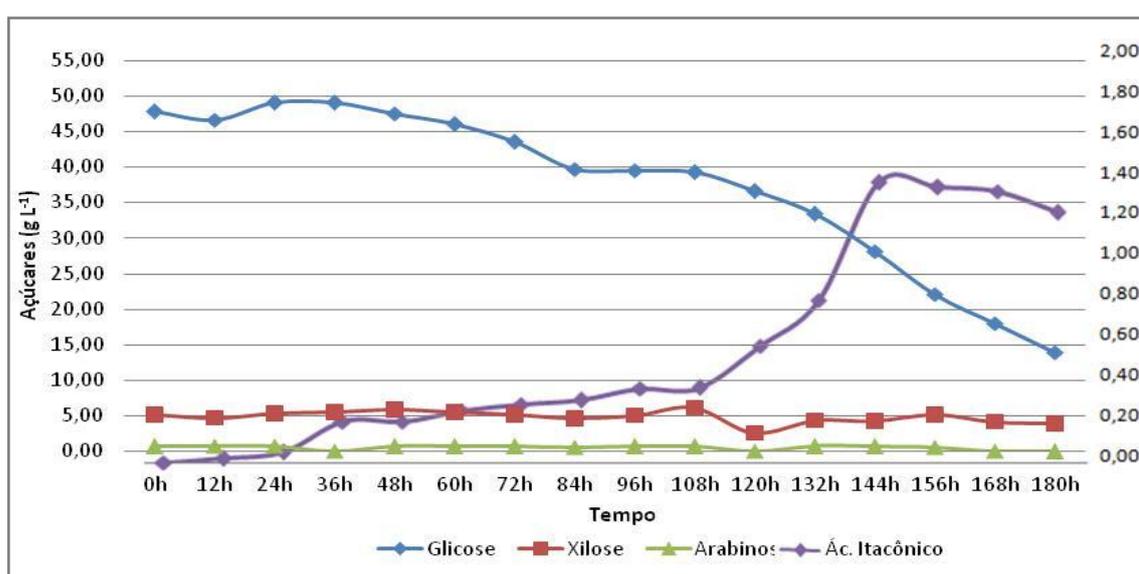


Figura 29 – Cinética da produção de ácido itacônico e consumo de açúcares (g L⁻¹) via fermentação com *A. terreus* a partir de hidrolisado da casca de arroz com 0,82% de HCl, 145 °C por 46 min.

É possível comparar-se os desempenhos obtidos e identificar similaridades nos mesmos, apesar dos valores de produção serem diferentes: enquanto o ensaio com adição de glicose (Figura 30a) atingiu a concentração de $5,7 \text{ g L}^{-1}$ de AI no meio, o ensaio sem adição de glicose (Figura 30b) chegou ao montante de $1,9 \text{ g L}^{-1}$. Os perfis de consumo de glicose e xilose são similares (iniciando pela glicose, sacarídeo de consumo preferencial pela cepa de *A. terreus* utilizada), e também os de produção de AI, sendo que o ápice de produção se deu em 152 h de processo, tempo esse similar ao verificado no experimento fermentativo anterior, e então tendido a uma ligeira diminuição dos valores de AI.

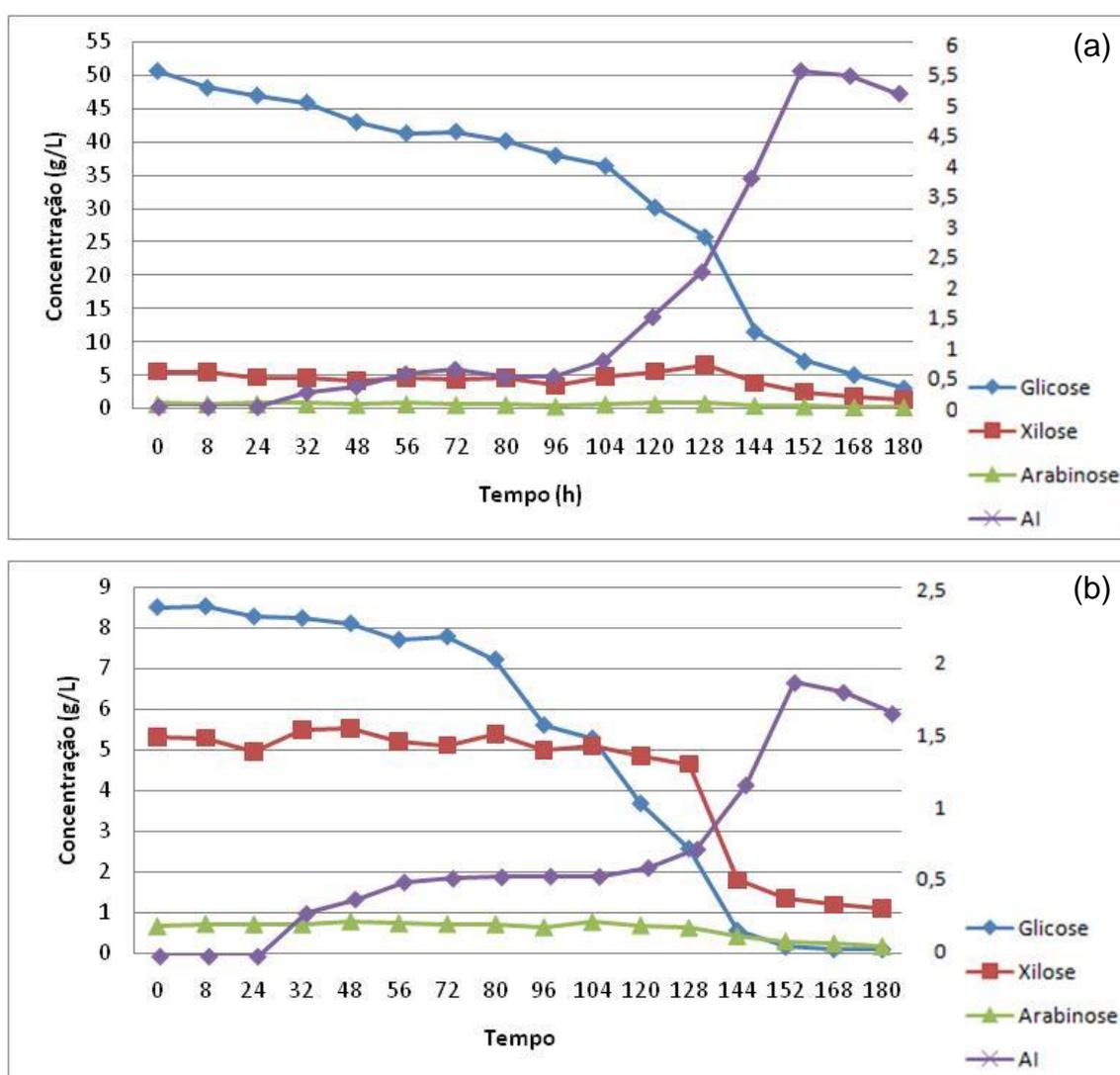


Figura 30 – Cinética da produção de ácido itacônico e consumo de açúcares (g L^{-1}) via fermentação com *A. terreus* em meio utilizando-se hidrolisado otimizado com (a) e sem (b) adição de glicose.

Os resultados aqui discutidos solucionaram, então, as dúvidas acerca da viabilidade do uso do hidrolisado da CA sem adições extras de glicose, comprovando a possibilidade de uso do referido meio otimizado. Presume-se, portanto, que as dificuldades obtidas ao longo do planejamento experimental descrito neste trabalho (quando à detecção de AI) foram relacionadas com as análises fora da faixa de trabalho (sensibilidade) da técnica analítica.

Ademais, vale destacar que a diferença na produção de AI entre os dois ensaios (que ficou em 300%), em virtude unicamente da adição de glicose ao meio, não justifica absolutamente essa adição, visto que para obter-se tal desempenho a concentração inicial de glicose era 500% maior, ou seja, estabelecendo uma relação desfavorável e longe de ser diretamente proporcional. Concluindo o raciocínio, uma simples etapa de pré-concentração do meio hidrolisado da CA poderia solucionar essa necessidade por uma maior quantidade inicial de sacarídeos, e isso não impactaria dramaticamente nos custos e tempo de processo, com o benefício de não envolver o custo da própria glicose adicionada.

No melhor do nosso conhecimento, nenhum trabalho na literatura faz menção ao emprego de CA para a produção de AI, via fermentação fúngica com *A. terreus* ATCC 7860. Outros trabalhos reportando produtividades de AI elevadas são encontradas atualmente, porém, fazem uso de meios sintéticos otimizados para a produção metabólica fúngica, em detrimento dos elevados custos e demandas que essas exigências nutricionais gerem.

Ademais, poucas pesquisas propondo a bioconversão de CA existem ou apresentam viabilidade técnica e econômica, o mesmo sendo válido para outras biomassas em geral. Este trabalho não objetivou a produção de AI em grande quantidade, mas somente demonstrar a possibilidade de produção de um bioproduto com projeção de crescimento expressivo a partir de fontes renováveis e subutilizadas, em semi-micro escala e fazendo-se uso da estrutura de um laboratório não-microbiológico. Igualmente não ficou-se preso à necessidade em comparar-se os dados aqui apresentados com os da literatura, uma vez que as condições operacionais são complexas e distintas: biomassas utilizadas, pré-tratamentos, hidrólises (ácida/alcalina e/ou enzimática) e condições envolvidas, adição ou não de nutrientes para a fermentação, escala de produção, micro-organismo(s) empregado(s), modos de fermentação, etc.

4.4 Avaliação econômica do processo

Almejando atestar a viabilidade econômica do processo de produção do Al a partir da CA, ainda que de forma primária, fez-se um balanço econômico aproximado do processo, levando-se em consideração prováveis custos necessários bem como rendimentos brutos de tal processo, sem demasiada preocupação com a aderência à realidade industrial – variável e dependente de inúmeros fatores, principalmente tendo-se em vista o escalamento do processo produtivo.

Dessa forma, adotando-se que o rendimento máximo de Al foi $1,9 \text{ g L}^{-1}$, tomando-se como base um montante de 1000 kg de CA (sem valor comercial), e empregando-se HCl como ácido para hidrólise, além da adição de meio BDA ao substrato fermentativo, extrato de levedura e CaO, obter-se-ia 13,4 kg de Al.

Uma vez que a matéria-prima do bioprocessos é um resíduo agrícola que não apresenta valor comercial, consideram-se apenas os custos dos reagentes (HCl, extrato de levedura e BDA) no cálculo do custo total de produção do Al como pode-se observar na Tabela 22.

Tabela 22 – Avaliação econômica da produção de Al a partir da casca de arroz.

Parâmetros	Custo						Produção
	CA	HCl	Açúcares	BDA (Glicose)	BDA (Batata)	Extrato Levedura	Al
Conc.	-	0,8%(v v ⁻¹)	18,4 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	20,0%(v v ⁻¹)	1,0%(v v ⁻¹)	1,9 g L ⁻¹
Montante	1000 kg	77 L	101,4 kg	75 kg	1000 kg	100 kg	19,0 kg
Valor (R\$)	-	2200	-	1080	2500	1500	26790
Saldo total: 26790 - 7280 = R\$ 19512,00 (R\$ 19,51 kg ⁻¹)							

Em se considerando que o valor comercial do Al é de R\$ 1410,00 kg⁻¹ (Sigma-Aldrich, >99%), fica clara a viabilidade econômica do bioprocessos investigado visto o saldo econômico aqui apresentado ser amplamente positivo, mesmo que calculado de maneira aproximada e desconsiderando-se outros fatores

de custo, tais como, investimento em equipamentos, manutenção, energia, mão-de-obra, transporte da biomassa até a indústria, entre outros custos operacionais.

Adicionalmente, uma série de outros produtos e subprodutos, advindos das etapas hidrolíticas e fermentativas, podem e são produzidos de forma concomitante ao AI, o que torna a CA uma matéria-prima com ainda maior potencial de valor agregado. Contudo, para que este raciocínio seja verdadeiro é preciso considerar uma visão condizente com o conceito de biorrefinaria, onde todos os produtos e subprodutos do processo são explorados ao máximo, o que já se faz nas atuais refinarias de petróleo.

Por fim, deve-se reconhecer que etapas de *downstream* são, em geral, tão onerosas quanto as etapas iniciais de processo e, após a fermentação para obtenção de AI, etapas como precipitação, destilação, extração por solvente, eletrodialise, osmose reversa e membranas líquidas surfactantes, que visam recuperar o produto de interesse, podem encarecer significativamente o processo. Mesmo que a pureza do AI possa ser levada à níveis de 99% comercialmente, os custos para atingir tal pureza devem ser considerados no momento de definir os critérios dos processos a serem adotados.

5 CONCLUSÕES

A pesquisa interdisciplinar, envolvendo áreas correlatas à química tais como engenharia e biotecnologia, permitem cobrir um campo inovador de processos mais limpos e com resultados promissores. A CA, biomassa residual do beneficiamento do arroz e sem valor agregado no contexto atual, possui potencial para ser utilizada como matéria-prima na produção de bioprodutos. Além dos dividendos possíveis de serem obtidos com essa abordagem, a contribuição apreciável para minimizar um problema ambiental no RS evidencia a validade da proposta e resultados obtidos neste trabalho.

As hidrólises da CA à pressão, em sistema Berghof, compreendendo o uso de H_3PO_4 e HNO_3 , demonstraram ser possível atacar a estrutura recalcitrante da CA e, dessa forma, produzir açúcares fermentescíveis na ordem de $44,4 \text{ g L}^{-1}$ (rendimento de $266,4 \text{ mg}$ de açúcar g^{-1} CA) para o ácido fosfórico ($145 \text{ }^\circ\text{C}$, por 28 min, com concentração de $3,4\%$ ($v v^{-1}$) de ácido), e $42,0 \text{ g L}^{-1}$ (rendimento de $252,0 \text{ mg}$ de açúcar g^{-1} CA) para o ácido nítrico ($135 \text{ }^\circ\text{C}$, por 35 min, com concentração de $3,76\%$ ($v v^{-1}$) de ácido), tendo sido somados os sacarídeos glicose, xilose e arabinose. Em geral, o perfil experimental obtido permite identificar que condições mais severas de operação priorizam a produção de glicose, enquanto condições experimentais mais brandas permitem liberar mais xilose e arabinose no meio.

A produção de compostos inibidores durante o tratamento hidrolítico ficou evidenciada e requer cuidados de destoxificação do meio a fim de permitir seu uso como substrato fermentativo (máximo de $4,34 \text{ g L}^{-1}$ de ácido fórmico e $14,6 \text{ g L}^{-1}$ de ácido acético, justamente quando as condições experimentais são mais extremas). Visando obter a diminuição/eliminação de tais compostos, foi testado com sucesso a utilização de CaO para regular o pH do meio e, concomitantemente, reagir com os compostos inibidores causando sua precipitação, tornando-os assim passíveis de serem filtrados.

Para o processo fermentativo foi escolhido o fungo *Aspergillus terreus* por sua característica metabólica de produção de AI, e um planejamento multivariado visou encontrar as melhores condições para seu crescimento, o que permitiu produzir $1,9 \text{ g L}^{-1}$, com rendimento de $109,9 \text{ mg AI g}^{-1}$ de açúcares (hidrolisado com HCl , com

adição de meio BDA (1:1) e $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, em pH 6,0, com 152 h de fermentação), e até $5,7 \text{ g L}^{-1}$ caso seja empregado um meio com adição de glicose no início da fermentação (o que gera rendimentos na ordem de $329,7 \text{ mg Al g}^{-1}$ de açúcares). Resultados esses que implicam na garantia de viabilidade técnica e econômica do processo proposto neste trabalho.

Trabalhando-se em escala semi-micro, em batelada, foi possível predizer estatisticamente que a CA provinda de beneficiamento parboilizado não difere da casca que não sofre esta etapa.

As ferramentas analíticas empregadas foram capazes de quantificar os produtos e subprodutos, restando uma ressalva aos limites de detecção e quantificação do sistema HPLC-RID, que carece de sensibilidade para trabalhos abaixo da faixa de concentração de mg L^{-1} .

Por fim, tendo em mãos os resultados obtidos, pode-se afirmar que a conversão da CA para a produção de Al demonstrou ter viabilidade técnica e econômica. E esta bioconversão foi demonstrada de forma simples, minimizando etapas unitárias, consumo de reagentes, assim obtendo custo reduzido sem comprometer a qualidade dos processos propostos.

6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- i) Comparação da abordagem hidrolítica ácida à pressão com alternativas como o emprego de micro-ondas e/ou ultrassom a fim de romper a matriz lignocelulósica da CA;
- ii) Realização de uma hidrólise enzimática subsequente à ácida com o intuito de elevar ainda mais os teores de açúcares;
- iii) Utilização do hidrolisado da CA, com emprego dos ácidos nítrico e fosfórico, como meio para fermentação, a fim de averiguar suas vantagens;
- iv) Maiores estudos das variáveis envolvidas na fermentação fúngica com *A. terreus* para produção de AI, empregando também diferentes espécies de fungos e bactérias.
- v) Empregar organismo que tenha sido geneticamente alterado visando o aumento da produção de AI, e assim verificar a aplicabilidade do mesmo dentro do processo proposto neste trabalho, ampliando então a produção, sem elevação de demais custos;
- vi) Recuperação do AI a partir da sua separação e purificação;
- vii) Otimização da metodologia cromatográfica de forma a permitir a determinação de mais açúcares presentes no meio;
- viii) Aumento da escala de processo, passando a operar em escala piloto a partir dos resultados existentes e, dessa forma, comprovar viabilidade do processo proposto em escalas maiores de operação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. M. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.

ALVIRA, V. *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. *et al.* Elucidation of the effect of ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

ANTUNES, A. M. de S. *et al.* **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 434 p., 2010

ARANTES, V. & SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Review. **Biotechnology for Biofuels**, 3:4, 2010.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

BEVILAQUA, D. B. **Produção biotecnológica de ácido succínico a partir de casca de arroz**. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

BEZERRA *et al.* Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p.965-977, 2008.

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

BOZELL, J. J. & PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – The US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, p. 539-554, 2010.

BRANDT, A. *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, p. 550-583, 2013.

CARLOS, R. M. & KHANG, D. B. Characterization of biomass energy projects in Southeast Asia. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 525-532, 2008.

CARTENSEM, F. *et al.* Continuous production and recovery of itaconic acid in a membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 179–187, 2013.

CHANG, C.; XU, G. & JIANG, X. Production of ethyl levulinate by direct conversion of wheat straw in ethanol media. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 93–99, 2012.

CHEN, W-H.; CHEN, C-J. & HUNG, C-I. Taguchi approach for co-gasification optimization of torrefied biomass and coal. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 615–622, 2013.

CHOI, C. H.; UM, B-H. & OH, K. K. The influence of screw configuration on the pretreatment performance of a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). **Bioresource Technology**, v. 132, p. 49 – 56, 2012.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. **Biomassa para energia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2011.

CUNHA-PEREIRA *et al.* Concersion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Biotechnology**, v.102, p. 4218-4225, 2011.

DAMARTZIS, T. & ZABANIOTOU, A. Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 366-378, 2011.

DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, v. 88, p. 17-28, 2011.

DOHERTY, T.V. *et al.* Ionic Liquid Solvent Properties as Predictors of Lignocellulose Pretreatment Efficacy. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1967-1975, 2010.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P. & FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 259-276, 2011.

DWIARTI, L. *et al.* Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. **J. Biosci. Bioeng.** 94 (1), p. 29–33, 2002.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>> Acesso em: 16 dez. 2013.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

FERREIRA, S.L. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta Review**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FERREIRA, V.R.; ROCHA, D.R. & SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FERREIRA-LEITÃO, V. *et al.* Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65-76, 2010.

FERRER, A. *et al.* Influence of temperature, time, liquid/solid ratio and sulfuric acid concentration on the hydrolysis of palm empty fruit bunches. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 506–511, 2013.

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

FOLETTTO, E. L. *et al.* Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

GENÉTIKA. **Genetika Research Center**. Disponível em: <<http://eng.genetika.ru/science/itaconic-acid/>> Acesso em: 10 jan. 2014.

GU, C. *et al.* Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 303–307, 2013.

HELLE, S. *et al.* Effect of inhibitory compounds in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentations by a genetically engineered strains of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 786-792, 2003.

HEREDIA-OLEA, E.; PÉREZ-CARRILHO, E. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 216–223, 2012.

HOSSEINI, S. M. & AZIZ, H. A. Evaluation of thermochemical pretreatment and continuous thermophilic condition in rice straw composting process enhancement. **Bioresource Technology**, v.133, p. 240-247, 2013.

HUANG, H. *et al.* A review of separation technologies in current and future biorefineries. **Separation and Purification Technology**, v.62, p. 1-21, 2008.

INCQS - **Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde**. Disponível em: <[http:// http://www.incqs.fiocruz.br/](http://www.incqs.fiocruz.br/)> Acesso em: 25 jul. 2013.

INMETRO - **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**. Disponível em: <[http:// http://www.inmetro.gov.br/](http://www.inmetro.gov.br/)> Acesso em: 05 jan. 2014

JI-LU, Z. Bio-oil from fast pyrolysis of rice husk: Yields and related properties and improvement of the pyrolysis system. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**, v. 80, p. 30–35, 2007.

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

JUY, M. I., OREGAS, J. A. & LUCCA, M. E. Study of itaconic acid production by *Aspergillus terreus* MJL05 strain with different variable. **Rev. Colomb. Biotecnol**, v. XII, n. 2, p. 158-168, 2010.

KAMM, B.; GRUBER, P.R. & KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-31027-4, Weinheim, Germany, 2006.

KANAMASA, S. *et al.* Cloning and functional characterization of the cis -aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 80 (2), 223–229, 2008.

KAWAMURA, D. *et al.* **Production of itaconic acid by fermentation.** JP-Patent 56 137 893 (to Iwata): 1981.

KERBAUY G.B. **Fisiologia vegetal.** 2ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008.

KESHWANI, D. R. & CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1515-1523, 2009.

KLEMENT, T. & BÜCHS, J. Itaconic acid – A biotechnological process in change. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 422–431, 2013.

KNAUF, M & MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, p. 147-150, 2004.

KRUSIC, M. K. *et al.* Polyacrylamide and poly (itaconic acid) complexes. **European Polymer Journal**, v. 40, p 793–798, 2004.

KURAKAKE, M.; IDE, N. & KOMAKI, T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. **Current Microbiology**, v. 54, p. 424-428, 2007.

LAKSHMI, G. S. *et al.* Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51–57, 2009.

LENIHAN, P. *et al.* Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 395–403, 2010.

LEE, J.W. *et al.* Microbial Production of building blok chemicals and polymers, **Current Opinion in Biotechnology**, 22 (6), p. 758-767, 2011.

LEVINSON, W.E., KURTZMAN, C.P. & KUO, T.M. Production of itaconic acid by *Pseudozyma Antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.824–827, 2006.

LI, A. *et al.* A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 602–611, 2011.

LIM, J. S. *et al.* A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable Energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084-3094, 2012.

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

LOPES, W.L. *et al.* Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. **Talanta**, v. 79, p. 1276-1282, 2009.

LUCAS, M. *et al.* Evidence for room temperature delignification of wood using hydrogen peroxide and manganese acetate as a catalyst. **Bioresource Technology**, v.119, p. 174–180, 2012.

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

MANIQUE, M. C. *et al.* Rice husk ash as an adsorbent for purifying biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 92, p. 56–61, 2012.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 21 dez. 2013.

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

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

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

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances Research review paper**, v. 26, p. 177–185, 2008.

MONTIPÓ, S. **Produção de ácido láctico a partir da casca do arroz**. 2012, 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

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

OCTAVE, S. & THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, p. 659-664, 2009.

OKABE, M. *et al.* Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.84, p. 597–606, 2009.

OLOFSSON, K., BERTILSSON, M. & LÍDEN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels Review**, p.1-7, 2008.

PANAKOVA, M. *et al.* High-level formation of itaconic acid by the fungus *Ustilago maydis*. **New Biotechnology**, v. 25s, 2009.

RAMBO, M. K. D. *et al.* Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p 634-639, 2013.

RAVEN, P.H. EVERT R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 830 p. 2007.

RISCALDATI, E. *et al.*. Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*. **J. Biotechnol.** 83 (3), 219–230, 2000.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria: A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2.ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 358 p., 2009.

ROSS, A. *et al.* Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 763–769, 2009.

RUIZ, E. *et al.* Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. **Bioresource Technology** v. 140, p. 292-298, 2013.

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

SALVACHÚA, D. *et al.* Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7500-7506, 2011.

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

SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SHEKHAWAT, D.; JACKSON, J.E. & MILLER, D.J. Process model and economic analysis of itaconic acid production from dimethyl succinate and formaldehyde. **Bioresource Technology**, v. 97, p.342–347, 2006.

SILVA, G. G. D. *et al.* Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 192–200, 2012.

SUTAS, J., MANA, A. & PITAK, L. Effect of Rice Husk and Rice Husk Ash to Properties of Bricks. **Procedia Engineering**, v. 32, p. 1061 – 1067, 2012.

SUXIA, R. *et al.* Furfural production from rice husk using sulfuric acid and a solid acid catalyst through a two-stage process. **Carbohydrate Research**, v. 359, p. 1-6, 2012.

TABUCHI T, & NAKAHARA, T **Preparation of itaconic acid**, JP-Patent 55 034 017 (to Mitsubishi):1980.

TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TEVZ, G.; BENCINA, M. & LEGISTA, M. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 1657–1664, 2010.

VADIVELLOO, J.; NEERFARISA, B. & FADEL, J. G. Nutritional improvement of rice husks. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, p. 299–305, 2009.

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.

WEBGARDEN. Blog de discussão sobre bio-combustíveis e assuntos relacionados. Disponível em : <http://www.biofuel.webgarden.com>> Acesso em: 15 dez. 2013.

WELTER, K. Biotechnological production of itaconic acid from renewable raw materials with immobilized cells. 2000 Tese de doutorado (Doutorado em Ciências Naturais) – Universidade Técnica de Braunschweig. Braunschweig, Alemanha, 2000.

WILKE, T. & VORLOP, K. D. Biotechnological production of itaconic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.56, p. 289-295, 2001.

YANG, W. *et al.* Solubility of itaconic acid in different organic solvents: Experimental measurement and thermodynamic modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 314, p. 180–184, 2012.

YOO, C.G.; LEE, C.W. & KIM, T. H. Optimization of two-stage fractionation process for lignocellulosic biomass using response surface methodology (RSM). **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4901-4909, 2011.

YU, Q. *et al.* Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592–598, 2013.

YU, Q. *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 210-215, 2013 (b)

ZAIM, M. F. M. *et al.* Production of rice husk ash for use in concrete as a supplementary cementitious material. **Construction and Building Materials**, v.25, p. 798–805, 2011.

ZHANG, X., MA, F. & LEE, D. Recovery of itaconic acid from supersaturated waste fermentation liquor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 583–585, 2009.

ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 367–375, 2008.

ZHANG, Z. *et al.* Low temperature pretreatment of sugarcane bagasse at atmospheric pressure using mixtures of ethylene carbonate and ethylene glycol. **Green Chemistry**. v.15, p. 255-264, 2012.

Apêndice

Apêndice A – Experimentos prévios envolvendo a produção de ácido itacônico a partir da casca de arroz

Assim que os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos e o fungo foi recebido, bem como a estrutura do laboratório esteve disponível, iniciou-se uma série de ensaios fermentativos anteriores aos descritos na seção 3.4, com vistas a avaliar a atividade fúngica e, igualmente, testar as condições experimentais descritas na literatura (ainda que muito restrita).

Dessa forma, uma série de hidrólises ácidas à pressão, em diferentes condições, bem como posteriores ensaios fermentativos foram pensados de forma a obter uma melhor compreensão das variáveis em estudo. Esse procedimento é recomendável a fim de garantir que, quando da execução de uma abordagem multivariada para os experimentos, já se esteja operando em faixa próxima da ideal.

A primeira etapa se utilizou, conforme Tabela 1, de hidrolisados obtidos em diferentes condições experimentais, e os resultados evidenciam que não houve consumo de glicose, bem como visualmente não foi possível detectar nenhum crescimento fúngico no meio.

Tabela 1 – Resultados obtidos no primeiro experimento fermentativo realizado em pH 4,0, com frascos de 20mL, a 37°C em 144h (Janeiro/2013).

Ensaio	Hidrolisado	Conc. Inicial glicose (g L ⁻¹)	Conc. Final glicose (g L ⁻¹)
1	HCl 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 175°C	9,49	8,90
2	H ₂ SO ₄ 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 175°C	8,56	8,45
3	HNO ₃ 1,4% (v v ⁻¹), 46 min, 175°C	4,00	4,00
4	H ₃ PO ₄ 1,9% (v v ⁻¹), 46 min, 175°C	3,90	3,80

Em posse desses resultados foi possível perceber que o meio em estudo se encontrava demasiadamente tóxico para o fungo, já que mesmo na presença de

glicose o fungo *A. terreus* foi incapaz de crescer e formar micélios. Optou-se por introduzir uma fração do meio utilizado para crescimento do inóculo no meio utilizado para fermentação, resultando então nos experimentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados obtidos no segundo experimento fermentativo realizado com hidrolisado (HCl 0,82% v v⁻¹), em pH 4,0, com frascos de 20mL, a 37°C em 144h (Março/2013).

Ensaio	% Hidrolisado	% Batata Dextrose	% Sol. glicose (25 g L ⁻¹)	Concentração de glicose (g L ⁻¹)	
				Inicial	Final
1	100	0	0	9,49	9,2
2	50	50	0	15	12
3	50	0	50	15,5	14,5
4	50	25	25	14,5	13,7

Este ensaio fermentativo permitiu evidenciar que o uso do meio Batata Dextrose Ágar tornou o meio hidrolisado menos tóxico ao fungo. Apesar de não ter sido possível detectar visualmente o crescimento fúngico, o decréscimo na concentração de glicose implica na prova de ter havido atividade fúngica.

Continuando no esforço de melhorar as condições fermentativas, foi aumentada a concentração do inóculo, passando do valor de 1×10^6 UFC, correspondendo a uma absorbância entre 0,09-0,13, para um valor de 1×10^7 UFC, correspondendo então a uma absorbância de valor 0,3. A condição da hidrólise também foi alterada para as condições experimentais de 46 min e 145 °C, com HCl a 0,8% (v v⁻¹), visando avaliar esta condição com menor carga de interferentes (MONTIPÓ, 2012) (Tabela 3).

A Tabela 3 expõe a resposta do fungo *A. terreus* ao meio fermentativo na ausência de hidrolisado, e o resultado obtido deste ensaio não é mais positivo (apesar da elevada concentração de glicose) em comparação ao ensaio 3 que contou com a presença do hidrolisado.

Tabela 3 – Resultados obtidos no terceiro experimento fermentativo realizado em pH 4,0, com frascos de 20mL, a 37 °C em 144 h (Abril/2013).

Ensaio	% Hidrolisado	% Batata Dextrose	Concentração de glicose (g L ⁻¹)	
			Inicial	Final
1	100	0	2,6	2,5
2	0	100	19,5	17,5
3	50	50	8,5	5,3

Neste ensaio foi possível, ainda, verificar a formação dos primeiros micélios fúngicos, indicando proliferação do fungo diante, acredita-se, do aumento na concentração do inoculo.

Ao planejar a próxima etapa, foi repensada a temperatura, até então mantida a 37 °C em virtude deste valor ser largamente citado na literatura. Este parâmetro também permite evitar contaminações bacterianas visto as bactérias se proliferarem em patamares inferiores de temperatura. O valor a ser testado foi de 30 °C e, para garantir que não ocorreria contaminação dos ensaios, foi feito plaqueamento das amostras em cada etapa do manuseio, em meio Mueller-Hinton.

A Tabela 4 exhibe os resultados obtidos, podendo-se perceber que além da variação da temperatura, nesta série de experimentos foi avaliado o uso de uma malha sintética como forma de facilitar a deposição dos micélios fúngicos e, assim, incrementar o crescimento e produção de AI (GU *et al*, 2013).

Tabela 4 – Resultados obtidos no quarto experimento fermentativo realizado em pH 4,0, com frascos de 20mL, a 30°C em 144h (Maio/2013).

Ensaio	Hidrolisado	Malha Sintética Abertura entre fibras (mm)	Concentração de glicose (g L ⁻¹)	
			Inicial	Final
1	HCl 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 145°C	-	8,47	5,8
2	HCl 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 175°C	-	8,6	8,5
3	HCl 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 145°C	2	8,9	8,2
4	HCl 0,8% (v v ⁻¹), 46 min, 145°C	3	8,3	7,7

Embora os resultados do consumo de glicose pelo fungo *A. terreus* não tenham sido elevados, pode-se perceber principalmente para o ensaio 1 descrito na tabela anterior, que o fungo se propagou de forma clara por toda a superfície do

frasco em questão. Tendo-se, em virtude disso, adotado a temperatura de 30 °C como novo patamar experimental, optou-se por avaliar o efeito do pH sobre o fungo. Sabe-se que valores maiores facilitam a contaminação bacteriana, porém, como a assepsia da metodologia aplicada já havia sido comprovada, elevou-se o valor de pH para 5,0.

A outra variação avaliada neste quinto ensaio fermentativo foi o emprego de CaO, descrito na seção 3.2.3. O experimento resultou, pela primeira vez, no consumo completo do açúcar presente no hidrolisado, sendo a concentração inicial de 8,3 g L⁻¹ de glicose, e o consumo total ter sido verificado após 120h de fermentação. Dessa forma o pH se mostrou uma das variáveis mais relevantes no processo, sendo determinante para o consumo de açúcar, independente do valor inicial deste.

Visando então encerrar os teste prévios, operou-se um ensaio fermentativo avaliativo do pré-tratamento com NaOH e NH₄OH sobre a CA antes de efetuar-se o processo de hidrólise àcida à pressão. Para tanto, o pH do meio foi mantido em 5,0, a temperatura de processo foi fixada em 30 °C, e o hidrolisado foi obtido via utilização de 0,8% v v⁻¹ de HCl, 45 min em 145 °C de temperatura.

A Figura 1 ilustra o ensaio descrito, e evidencia que os ensaios controles foram obtidos a partir de hidrolisados de CA que não sofreram o nenhum dos dois pré-tratamentos sob avaliação, seja a CA provinda de beneficiamento por parboilização ou não.

O perfil ilustrado na Figura 1 demonstra que não houve ganho quanto ao consumo de glicose por parte do micro-organismo fúngico, e isso pode ser derivado de vários fatores (o próprio micro-organismo, as condições experimentais ainda não otimizadas, a natureza dos reagentes químicos usados), contudo, considerando-se que ao fim do processo não houve diferença significativa entre os ensaios que empregaram os pré-tratamentos (restou apenas 11,63% da glicose inicial no ensaio empregando hidrolisado sem tratamento, e entre 19 – 41% da glicose inicial nos casos em que foi dispensando algum tratamento químico), novas avaliações foram descartadas e, por uma questão simples de redução de etapas unitárias e menor consumo de reagentes, esses pré-tratamentos foram considerados insatisfatórios (e assim não foram doravante utilizados).

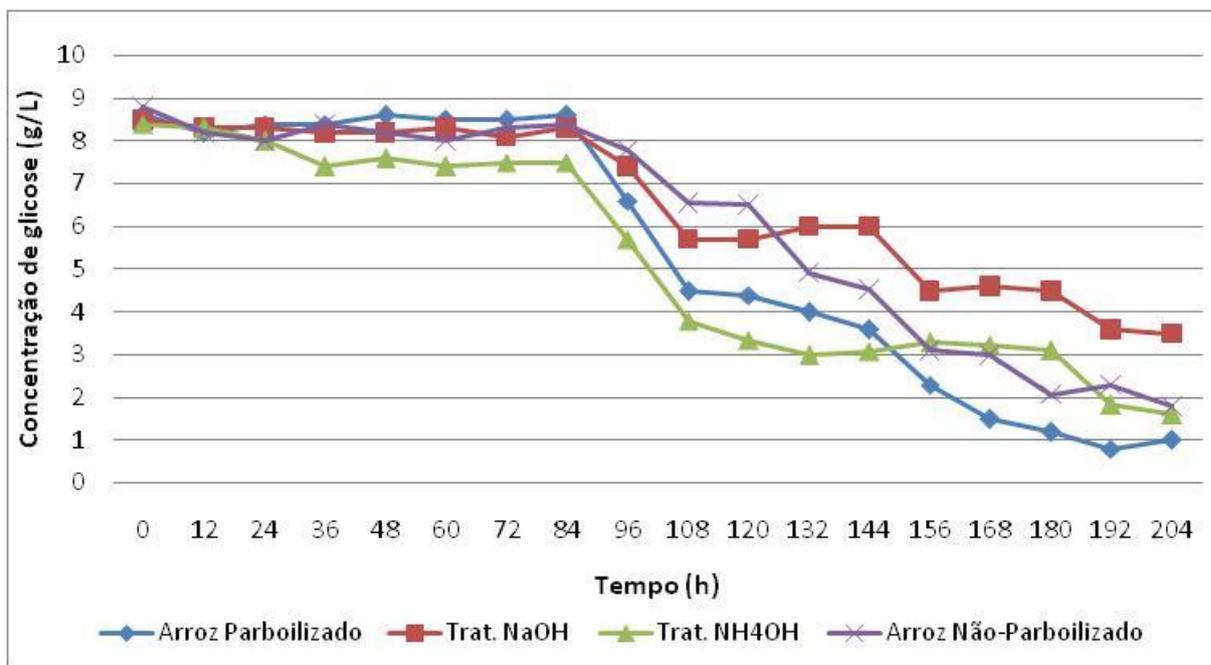


Figura 1 – Acompanhamento dos ensaios fermentativos (a cada 12 h) avaliando pré-tratamentos químicos anteriores à hidrólise ácida à pressão (Junho/2013).

Por fim, em relação às abordagens com NaOH e NH₄OH, os resultados inexpressivos podem ser considerados como consequência das condições utilizadas nos ensaios, ou seja, os resultados positivos que esses tratamentos geraram em outros trabalhos foram obtidos com outros materiais que não a CA, e assim existe a possibilidade de que condições mais severas (de temperatura, tempo de tratamento e concentração do reagente) poderiam surtir melhores efeitos. Isso leva, invariavelmente, à proposição de ensaios futuros avaliando esta possibilidade, principalmente em considerando-se a avaliação de tais tratamentos em ensaios fermentativos que seja feitos nas condições otimizadas obtidas ao longo deste trabalho.