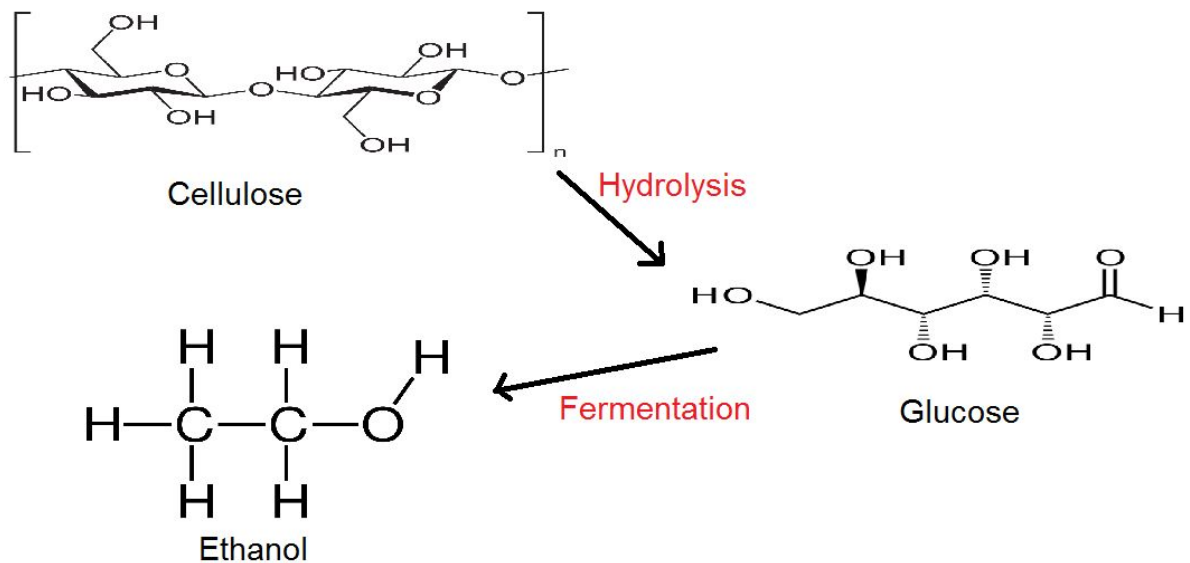


Graphical Abstract



This scheme represents the process of hydrolysis of the cellulose into glucose and the action of microorganisms on that sugar by the process of fermentation, which produces ethanol

ESTUDO DE METODOLOGIA PARA A BIOCONVERSÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE CASCA DE ARROZ EM ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

**Jefferson S. Marcolino^a, Jorge L. Miranda Jr.^a, Thales J. J. P. Martins^{a,*}, André L. F. Souza,
Julio L. Silva Jr.**

^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense - Campus Araquari, 89245-000
Araquari – SC, Brasil

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

() Manuscrito com material suplementar

(X) Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: thalespmartins@gmail.com

STUDY OF METHODOLOGY FOR BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS OF RICE HULL INTO SECOND GENERATION ETHANOL

The rice harvest leaves a residue, its hull, which does not have a significant added value and is often burned. Another possible solution to it is the conversion of rice hull's lignocellulosic biomass into ethanol. That conversion pass through several stages, which are the hull hydrolysis and the fermentation, which is a very important step on the process, for it does the breaking of the long chain sugars, which are not digested by the microorganisms that will do the fermentation, into short chain sugars. For the realization of that step, it was used the acid hydrolysis, using a solution of phosphoric acid. The ethanol produced by the fermentation of sugars from a process of hydrolysis is called second generation ethanol, the first generation being produced from the direct fermentation of sugars that do not need to be hydrolysed. The objective of that work was to realize the bioconversion of biomass into ethanol by using the acid hydrolysis and to analyse the yield of that process.

Keywords: ethanol; hydrolysis; fermentation; rice hull.

INTRODUÇÃO

O arroz é uma cultura muito produzida no Brasil, principalmente na região sul.¹ No caso do estado de Santa Catarina essa produção atualmente possui um dos maiores rendimentos do Brasil, cerca de 7,1 t/ha.² Depois de colhido, é separado da casca, a qual representa um resíduo lignocelulósico de baixíssimo valor agregado.^{3,4} Esse resíduo, geralmente é usado como fonte de energia, por meio da combustão, para os processos de secagem e parboilização do arroz, e depois suas cinzas são usadas na fabricação de cimento usado na construção civil.^{5,6} Entretanto, 50 % do peso deste resíduo é celulose, e o mesmo poderia ser utilizado para a produção de etanol de segunda geração, agregando valor e atenuando possíveis problemas associados ao descarte ou destinação final deste resíduo.^{3,7}

Além de agregar valor e amenizar os problemas com esse resíduo, existe também a possibilidade de usar o etanol que será produzido como combustível diminuindo assim o uso de combustíveis fósseis que, em sua queima, liberam CO₂, que não volta para o ciclo de produção dos tais combustíveis, e é tido como um dos principais agentes causadores do aquecimento global. Já o CO₂ liberado na combustão do etanol pode ingressar no ciclo de vida do arroz, contribuindo pouco para o aumento líquido da concentração do CO₂ na atmosfera.

O etanol é produto da fermentação alcoólica, juntamente com o dióxido de carbono, além de outros, como por exemplo, o metanol. O etanol pode ser produzido de diferentes matérias-primas e com base nisso a produção do etanol é classificada em três tipos: o etanol de primeira, segunda e terceira geração, cada um com a uma matéria prima diferente.^{8,9} O etanol de segunda geração, em questão, provém da hidrólise de carboidratos complexos, como a celulose, obtendo-se açúcares redutores para, então, serem convertidos a etanol.^{10,11}

A hidrólise é a reação de quebra de uma molécula, isto é, das ligações químicas que a compõem, dando origem à novas moléculas, pela ação da água. A hidrólise pode ser ácida, quando ocorre pelo fato das altas concentrações de cátions hidrogênio (H⁺), ou básica, quando os ânions hidroxila (OH⁻) da solução ficarem em altas concentrações, fazendo com que uma determinada molécula se fragmente e tenha suas ligações complementadas pelos íons vindos da água, esse processo visa a formação de novas moléculas menores, as quais são diferentes de suas precursoras.¹²⁻¹⁵ A hidrólise enzimática, por sua vez, é feita por proteínas que atuam na quebra da celulose, chamada celulasas, que com consequência de sua alta especificidade do material e da ligação que deve ser quebrada, tem um alto rendimento e poucos produtos indesejados.^{16,17}

A fermentação pode ser definida como o catabolismo da matéria orgânica por meio de reações químicas. Sendo assim, é um processo onde um microrganismo age num substrato orgânico, culminando na produção de uma nova substância ou substrato, como é o caso do etanol. A fermentação pode ocorrer em um meio de cultivo onde haja algum açúcar fermentescível. Os meios de cultivo, ou meios de cultura, são substâncias que contém nutrientes requeridos para o crescimento de microrganismos. Sua composição deve conter nutrientes essenciais para os microrganismos, em concentrações suficientes para que o crescimento deles não seja inibido. Os nutrientes formadores do meio do cultivos podem ser definidos em vista do favorecimento de um ou outro microrganismo, estes seriam os meios de cultivo seletivos.¹⁸

Pensando no aproveitamento da casca de arroz como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, o desenho de um processo interessante poderia incluir a etapa de hidrólise enzimática seguida da fermentação por leveduras. Uma alternativa à utilização de enzimas comercialmente disponíveis, que possuem alto custo, poderia ser a utilização de enzimas provenientes de cultivo microbiano capazes de hidrolisar a parede celular da casca de arroz. Neste sentido, aparecem como promissores os microorganismos provenientes do rúmen bovino. O rúmen é a primeira repartição do estômago do ruminante.¹⁹ Nele se tem um grande desenvolvimento de microbiota extremamente complexa constituída de archaeas, bactérias, protozoários, entre outros, permitindo o aproveitamento eficiente de vários nutrientes, principalmente para produção de açúcares, a partir da hidrólise, das paredes celulares vegetais, constituídas principalmente de celulose, qual essa reação que é essencial para a sustentação corporal tanto dos microrganismos como a dos ruminantes.¹⁹⁻²¹

Assim, o objetivo deste trabalho foi de utilizar resíduos de arroz para a produção de etanol de segunda geração, utilizando hidrólise ácida e enzimática para a quebra do biopolímero presente na casca. A produção do etanol será proveniente da fermentação, por *Saccharomyces cerevisiae*, dos açúcares resultantes. Também foi objetivo deste trabalho determinar o rendimento desse processo, considerando a quantidade de etanol produzida em relação à quantidade de casca de arroz utilizada.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparação da amostra

As cascas de arroz foram secas em estufa, a 40°C, até passarem a manter sua massa constante, sendo após trituradas em um liquidificador doméstico com a finalidade de reduzir a sua granulometria. Após peneiramento, as cascas trituradas foram separadas de acordo com sua granulometria, nas seguintes frações: 1-12 Mesh (partículas com diâmetro médio maiores que 1,7 mm), 12-16 Mesh (média de 1,44 mm de diâmetro), 16-20 Mesh (diâmetro médio de 1,015 mm), 20-40 Mesh (diâmetro médio de 637,5 µm), 40-50 Mesh (diâmetro médio de 362,5 µm), 50-60 Mesh (diâmetro médio de 275 µm), 60-100 Mesh (diâmetro médio de 200 µm), 100-140 Mesh (diâmetro médio de 128 µm), 140-200 Mesh (diâmetro médio de 90,5 µm), 200-230 Mesh (diâmetro médio de 69 µm), 230-400 Mesh (diâmetro médio de 50,5 µm) e 400-500 Mesh (diâmetro médio de 31,5 µm) foram obtidas. A separação das cascas nestas frações tinha como objetivo prover matéria-prima com diferentes tamanhos médios que poderiam ser adequadamente selecionadas para aplicação nas próximas etapas.

Isolamento dos microrganismos

Uma parte dos microrganismos utilizados foi retirada do complexo ruminal e outra parte foi retirada de cascas de arroz em processo de decomposição, utilizando-se de uma solução salina para isso. Eles foram inoculados em meios de ágar com as frações de casca de arroz triturada com tamanhos médios de 362,5 µm, 275 µm, 200 µm e 128 µm, e também em meios de ágar com carboximetilcelulose, de forma a separar os microrganismos produtores de celulase e os que não produtores. Os meios possuíam a seguinte composição: tampão fosfato 50 mmol/L de pH 8; CaCl₂ 1,0 mmol/L e; ágar 15 g/L.

Hidrólise

Foram testados dois tipos de hidrólise: a enzimática e a ácida. Para a hidrólise enzimática, foi utilizado o complexo de microrganismos presentes no rúmen bovino, com 50 ml de meio líquido, contendo tampão fosfato de pH 7,5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a hidrólise ácida foram preparadas três soluções de ácido fosfórico de concentrações 12% (m/m), 18% (m/m) e 24% (m/m)²⁵. Em seguida, amostras de 5 g de casca de arroz, composta pelas

frações com tamanhos médios de 1,015 mm (29,6%), 637,5 µm (39,7%), 362,5 µm (5,2%) e 275 µm (2,6%) foram misturadas, em erlenmeyers de 100 mL, com as soluções de ácido fosfórico. A mistura foi mantida uma temperatura de 60 °C por 4 horas, com posterior ajuste de pH para a faixa onde as leveduras estão habituadas, que fica em torno de 7,5. O experimento foi realizado em triplicata, com uma amostra controle, consistindo de uma mistura contendo 5 g de casca de arroz triturada e água, em vez de ácido fosfórico, totalizando 10 erlenmeyers.

Fermentação

A fermentação dos açúcares provenientes da hidrólise foi realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, marca Fleischmann ®, sendo adicionados 1g da levedura comercial nos próprios erlenmeyers, com um balão inflável acoplado a abertura de cada erlenmeyer, e durou 10 dias a 32 °C. Quando foi realizada a hidrólise enzimática, as leveduras foram colocadas uma semana depois do complexo de microrganismo do rúmen bovino, a fim de garantir que já houvessem açúcares disponíveis para que a fermentação ocorresse; quando foi realizada a hidrólise por meio ácido, as leveduras foram adicionadas ao final do processo de hidrólise, após neutralização do pH do meio.

Métodos Analíticos

A hidrólise dos polissacarídeos da casca de arroz foi avaliada pelo método do DNS.²⁶ Uma amostra de 1,0 mL do produto de hidrólise neutralizado com NaOH (98% de pureza) até alcançar o pH 7 foi misturada a 0,5 mL de água destilada e 1,0 mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), seguido de aquecimento a 100 °C por cinco minutos. Após, 6,5 mL de água destilada foram adicionados às amostras e as absorbâncias lidas em comprimento de onda de 540 nm utilizando um espectrofotômetro da marca Rayleigh. A quantidade de açúcar foi determinada a partir de uma curva padrão de glicose.²⁵

O etanol foi identificado através da reação de oxi-redução entre o íon dicromato e o álcool, pela adição de uma solução sulfocrômica 0,01 mol.L⁻¹ de dicromato de potássio (dissolução do sal em ácido sulfúrico concentrado) às amostras do fermentado filtrado. Soluções de etanol assumem uma

coloração verde quando misturadas com soluções de dicromato, sendo possível identificar, de forma visual, a presença de etanol na solução inicial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Hidrólise

Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática, foi testada primeiro e foi disponibilizado um tempo maior para a atuação dos microrganismos, tanto os que realizaram a hidrólise, como as leveduras, que foram colocadas no meio com a intenção delas fazerem a fermentação dos açúcares produzidos pela ação das enzimas excretadas pelos microrganismos do rúmen bovino. Nesse sentido, as leveduras foram inoculadas no reator produzido uma semana após os microrganismos do rúmen bovino. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração no meio reacional que evidenciasse a ocorrência da fermentação, como a formação de CO₂, por exemplo. É possível que o complexo de microrganismos do rúmen, além de excretar a celulase, utilize todo o açúcar hidrolisado para o seu próprio metabolismo, e para o animal ruminante são entregues os produtos do metabolismo dos microrganismos. Desta forma, consideramos que a inoculação das leveduras foi realizada de forma tardia, pois os complexo ruminal, além de hidrolisar a celulose, havia também metabolizado o produto da quebra, fazendo indisponível para os fungos o açúcar resultante.

Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada utilizando uma variação do método de Moscon²⁵, que utilizou ultrassom para auxiliar o processo de hidrólise com ácido fosfórico, enquanto no presente trabalho optou-se pela não utilização de ultrassom. A reação ocorreu a 60 °C por 4 h. A quantidade de açúcar obtida, expressa em mg/mL, em função da concentração de ácido fosfórico é apresentada na Figura 1 a seguir.

Determinação da concentração de açúcares redutores provenientes da hidrólise da casca de arroz

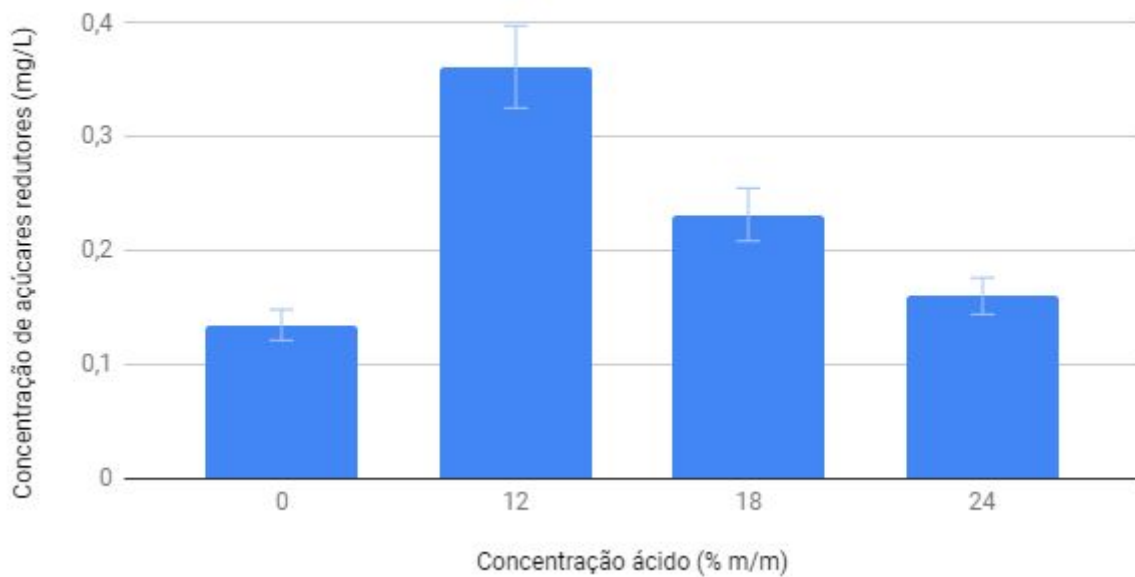


Figura 1. Concentração de açúcares fermentáveis obtidas em função da concentração do ácido fosfórico utilizado

Como observado no gráfico, conforme a concentração de ácido aumenta, menor a quantidade de açúcar produzida. Isso pode ser explicado pelo fato de que, para elevados tempos de residência, o ácido pode catalisar a reação de degradação dos açúcares formados em subprodutos, como o furfural e o hidrometilfurfural²⁶. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos²⁸⁻³⁰. O furfural inibe a fermentação, uma vez que é tóxico às leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.³¹

Identificação do Etanol

Nessa etapa foi, em um primeiro momento, usado um método que envolvia a espectrofotometria, o teste do bafômetro, que consiste numa reação colorimétrica envolvendo a oxidação do etanol pelo íon dicromato formando, assim, uma coloração esverdeada na solução, devido à produção de acetato. Entretanto, este método se demonstrou inadequado para quantificação do etanol produzido devido à sua baixa precisão.

Outro método utilizado foi uma titulação de retorno, como descrito por Santos *et al.*³², na qual a solução com etanol deve ser misturada com uma quantidade conhecida de dicromato em excesso, dando uma cor verde à solução, após isso deve se adicionar uma quantidade conhecida de íon iodeto e este depois deve ser titulado com com tiosulfato de sódio até atingir o ponto de equivalência, observando-se a formação de uma coloração azulada na solução. Esse método também se mostrou inadequado, já que a solução com etanol não era transparente, e então se mostrou difícil a visualização do ponto de equivalência. A coloração verde resultante da oxidação do etanol pelo íon dicromato e da formação de acetato, ainda que fraca, pode ser observada na Figura 2. Desta forma, foi possível verificar a produção de etanol apenas de forma qualitativa. Todos os resultados apontam para a necessidade de otimizar o processo de produção do etanol a partir da casca de arroz, avaliando os fatores que podem ser significativos nas diferentes etapas de processo (pré-tratamento, que não foi realizado neste trabalho, hidrólise e fermentação), bem como seus valores ideais. Além disso, poderia também fazer parte de estudos futuros a seleção dos métodos analíticos mais adequados para a identificação e quantificação do etanol.

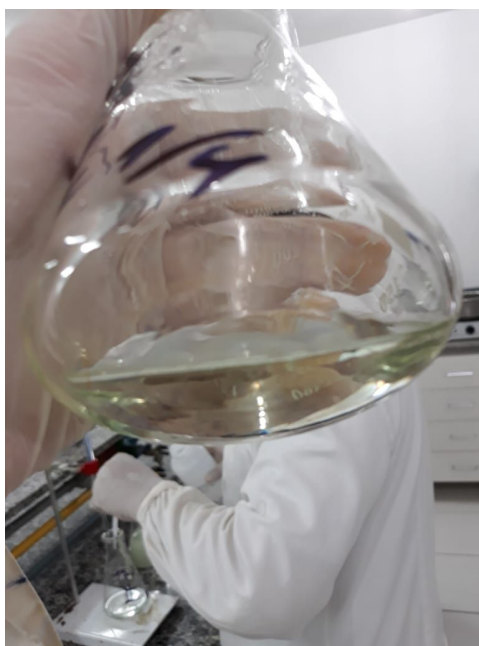


Figura 2. Mistura de solução de etanol com o íon dicromato, resultando na oxidação do álcool

CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados, podemos concluir que a hidrólise enzimática seguida de fermentação como inicialmente desenhada não se mostrou eficiente para a produção de etanol. Na

hidrólise enzimática, verificou-se que os microrganismos do complexo ruminal utilizaram o produto da quebra do material lignocelulósico para seu próprio metabolismo, não ficando os açúcares gerados disponíveis e assim impedindo que as leveduras pudessem realizar a fermentação, não produzindo etanol.

Por outro lado, a hidrólise ácida utilizando ácido fosfórico foi realizada, mas não foram obtidas concentrações significativas de açúcar que viabilizassem a produção de etanol na etapa da fermentação. O maior rendimento final de açúcar foi obtido com utilização da solução de 12% de ácido fosfórico. Os resultados sugerem que a utilização de soluções mais diluídas de ácido fosfórico e baixos tempos de residência poderiam resultar em rendimentos maiores de açúcares.

Não foi possível calcular o rendimento do processo, pois os métodos analíticos utilizados para quantificar a concentração de etanol não foram adequados.

Nesse sentido, concluímos que a produção de etanol de segunda geração a partir da casca de arroz é possível, mas são necessários alguns ajustes no processo, para aumentar o rendimento da hidrólise e como consequência o rendimento de etanol.

REFERÊNCIAS

1. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/50/agro_2006_agricultura_familiar.pdf, acessada em Maio 2018.
2. http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/tabelas_producao/Comparativo_SC_2017.xls, acessada em Maio 2018.
3. Hickert, L. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.
4. Saha, B.; Cotta, M.; *Biomass Bioenergy* **2008**, 32, 971 – 977.
5. Tashima, M. M.; Sousa, L. C.; Akasaki, J. L.; da Silva, E. J.; Melges, J. L. P.; Bernabeu, J. J. P.; *HOLOS Environment* **2011**, 11, 81.

6. Silva, E. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil, 2009.
7. Pouey, M. T. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.
8. Moraes, P. P.; Pascoal, P. V.; Rocha, E. de Sá.; Martins, E. C. A.; *Bioenergia em Revista* **2017**, 7, 45-57.
9. Ruele, R.; Boaventura, J. M. G.; Fischmann, A. A.; Sarturi, G.; *Technol. Forecast. Soc. Change* **2014**, 87, 205-223.
10. Cardona, C. A.; Sánchez, O. J.; *Bioresour. Technol.* **2007**, 98, 2415-2457.
11. Sivakuman, G.; Vailum, D.; Xum, J.; Burnez, D.; Lay, J.; Gem, X.; Weathers, P.; *J. Biobased Mater. Bioenergy* **2008**, 2, 100-120.
12. <https://www.infoescola.com/reacoes-quimicas/hidrolise/>, acessada em Maio 2018.
13. de Paula, M. P.; Lacerda, T. M.; Zambon, M. D.; Frollini, E.; *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Foz do Iguaçu, Brasil, 2009.
14. Xiang, Q.; Lee, Y. Y.; Pettersson, P. O.; Torget, R. W.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2003**, 107, 505-514.
15. de Paula, M. P.; Lacerda, T. M.; Frollini, E.; *eXPRESS Polym. Lett.* **2008**, 2, 423-428.
16. Segel, I. H. Em *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State enzyme systems*; Segel, I. H., eds.; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1993.
17. de Carvalho, M. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2011.

18. <http://www.splabor.com.br/arquivos/Ebook%20-%20Meios%20de%20Cultura.pdf>, acessada em Maio 2018.
19. <http://knoow.net/ciencterravida/biologia/rumen/>, acessada em Maio 2018.
20.
<https://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo-estudo-dos-principais-microorganismos-do-rumen>,
acessada em Maio 2018.
21. Teixeira, J. C.; *Monografia de Especialização*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 1997.
22. Furlan, V. J. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2009.
23. Schmidell, W. Em *Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica*; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, 2001.
24. Moraes, O. I. Em *Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica*; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, 2001, cap. 9.
25. Moscon, J. M.; Silva, J. R. F.; Foletto, E. L.; Jahn, S. L.; Kuhn, R. C.; Cancelier, A.; Mazutti, M. A.; *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, São Paulo, Brasil, 2015.
26. Summer, J. B.; *Biol. Chem.* **1924**, 2, 287-290.
27. Rodrigues, F.A; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
28. Kempka, A. P.; Silva, I. L.; Santolin, G. R.; Canton, J. P.; Becegatto, V.; Souza, S. M. A. G. U.; Prestes, R. C.; *Anais do 25º Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Santa Catarina*, Florianópolis, Brasil, 2015.

29. Janga, K. K.; Hägg, M. B.; Moe, S. T.; *Bioresources* **2012**, 7, 391-411.
30. Dussán, K. J.; Silva, D. D. V.; Moraes, E. J. C.; Arruda, P. V.; Felipe, M. G. A.; *Chem. Eng. Trans.* **2014**, 38, 433-438.
31. Boyer, L. J.; Vega, J. L.; Klasson, K. T.; Clausen, E. C.; Gaddy, J. L.; *Biomass Bioenergy*. **1992**, 3, 41-48.
32. Santos, T. L.; Anjos, V. E.; Inaba, J.; Viana, A. G; *Anais do 13º CONEX - Conversando sobre Extensão*, Ponta Grossa, Brasil, 2015.