



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E
BIOLÓGICA – PPGTQB

ESTUDOS SOBRE O USO DO ARROZ *BRS AG* PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ISABELA CASTRO DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.

Brasília, Junho de 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
QUÍMICA E BIOLÓGICA – PPGTQB**

**ESTUDOS SOBRE O USO DO ARROZ *BRS AG* PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL**

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de Brasília
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre.*

ISABELA CASTRO DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.

Brasília, Junho de 2017

FOLHA DE APROVAÇÃO



Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) Isabela Castro de Almeida, matrícula nº 15/0102542, intitulada “Estudos sobre o uso do arroz BRS AG para a produção de Etanol”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 6 de junho de 2017.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Dr. Rossano Gambetta
Membro Suplente (Embrapa Agroenergia)

Em 6 de junho de 2017.

DEDICATÓRIA

*À minha família, por sempre estar ao meu lado.
Aos meus orientadores, por todo apoio e confiança transmitidos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre guiar meus passos, me dar força e me mostrar que por mais difícil que a situação pareça eu não devo desistir.

A minha mãe Márcia, e a minha irmã Natália, por sempre estarem ao meu lado, nos momentos alegres e nas dificuldades. Vocês são minha base, meu porto seguro, motivo de maior orgulho, e sem vocês nenhum dos meus sonhos se tornariam realidade. Mãe, obrigada por me erguer sempre que preciso, por me fazer enxergar que sou capaz de atingir todos os sonhos e objetivos, basta dedicação. Irmã, obrigada por fazer importante os momentos mais simples, e por sempre me fazer sorrir. Seu jeito único de ser me cativa todos os dias.

Ao meu pai, Manoel, por me mostrar todos os dias que as dificuldades estão aí para serem vencidas, e que cada tropeço serve para me fortalecer ainda mais.

Agradeço a todos da minha família, que vivenciaram cada conquista que tive durante minha vida. Vocês sempre me deram força para continuar.

A todos os meus amigos e amigas, especialmente a Rayssa. Minha melhor amiga, cúmplice e confidente. Obrigada por tudo que você faz por mim, agradeço por cada conselho e cada puxão de orelha.

A Universidade de Brasília, e a Unidade Embrapa Agroenergia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Aos orientadores Fabricio Machado e Sílvia Belém, por todo conhecimento transmitido e pela confiança em meu trabalho. Agradeço pela dedicação, pelas inúmeras correções e por toda paciência que tiveram comigo.

Agradeço a todos do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia, que tornaram possível esse estudo e me ajudaram de alguma forma, em especial aos queridos amigos Andréia, Débora, Mayara, Mayume, Pedro e Renan.

Agradeço de todo o coração a Jamille. Não teria conseguido sem seu apoio e ajuda. Obrigada pelas conversas, broncas, gargalhadas, almoços *fitness*, idas ao shopping.

RESUMO

O presente trabalho avaliou o potencial de utilização do arroz BRS AG, desenvolvido pela Embrapa Clima Temperado, como biomassa para a produção de etanol. Comparativamente, também foram realizados estudos sobre a conversão do arroz comercial (BRS PAMPA) em etanol. Inicialmente o amido presente no arroz é hidrolisado à açúcares monoméricos fermentáveis, glicose, para posterior processo de fermentação. Isso porque a principal levedura utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, não consegue converter diretamente o amido em etanol. O processo de conversão do amido presente no arroz comercial (BRS PAMPA) em glicose foi otimizado, variando-se o tempo de ação das enzimas, para posterior utilização das melhores condições reacionais na hidrólise do arroz BRS AG. Na reação de hidrólise que levou a maior concentração final de glicose (130,16 g/L), a etapa de liquefação com a enzima Termamyl 2X ocorreu por 1 h, seguida da sacarificação com a enzima AMG 300 L por 3 h. Adotando-se as mesmas condições reacionais, obteve-se 133,28 g/L de glicose para a hidrólise com o arroz BRS AG. Avaliou-se o comportamento de diferentes linhagens comerciais da levedura *S. cerevisiae*: BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, em reações de fermentação dos hidrolisados de arroz, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 32 °C, conduzidas em Shaker Orbital. Os maiores rendimentos das fermentações com o hidrolisado de arroz comercial foram obtidos pelas leveduras SA-1, rendimento de 93% e concentração final de etanol de 58,92 g/L, e CAT-1, rendimento de 92,7% e concentração final de etanol de 58,93 g/L. Para as fermentações com o hidrolisado de arroz gigante, os maiores rendimentos foram obtidos pelas leveduras FT-858, rendimento de 94,8% e concentração final de etanol de 66,13 g/L, e CAT-1, rendimento de 94,4% e concentração final de etanol de 65,85 g/L. Após análise dos resultados obtidos para as fermentações com as diferentes linhagens da *S. cerevisiae*, a levedura CAT-1 foi utilizada nas fermentações realizadas em reator. O rendimento para a fermentação com arroz comercial foi de 57,9% e para o arroz gigante 59,2%. Os valores obtidos foram baixos em comparação as fermentações realizadas com essa levedura para os hidrolisados de arroz em erlenmeyer no sistema de agitação em Shaker Orbital. O volume ocupado no reator com os respectivos hidrolisados de arroz correspondia a 30% do volume total. Em contrapartida, ocupou-se 56% do volume total do erlenmeyer com os hidrolisados para as fermentações realizadas em Shaker Orbital. Com isso, a maior quantidade de oxigênio presente nas fermentações em reator favoreceu o crescimento celular, à fermentação anaeróbica, obtendo-se menor rendimento de etanol. Além disso, os valores obtidos para o rendimento de etanol

após fermentação dos hidrolisado foram baixos em comparação a plantas eficientes de produção etanol de milho. Dessa forma, esse trabalho possui como perspectivas futuras a otimização dos parâmetros fermentativos, visando a melhoria do processo, a obtenção de maiores rendimentos de etanol, e menor formação de coprodutos. Como um estudo preliminar, o processo de obtenção de etanol a partir de arroz (BRS AG e comercial) foi simulado com o auxílio do software Aspen Plus®, permitindo estabelecer condições operacionais para determinação dos balanços de massa das correntes de processo. Resultados das simulações mostraram que existe um grande potencial de simuladores de processos químicos aliados as informações provenientes de fermentações realizadas em escala de laboratório.

ABSTRACT

The present study evaluated the potential of BRS AG, also called giant rice, as biomass for ethanol production. Comparatively, studies on the conversion of commercial rice (BRS PAMPA) into ethanol were also carried out. Initially the starch present in the rice is hydrolyzed into fermentable monomeric sugars, glucose, for later fermentation process. This is because the main yeast used, *Saccharomyces cerevisiae* don't convert the starch to ethanol directly. The starch conversion present in commercial rice (BRS PAMPA) to glucose was optimized varying the time of enzymes action. The best reaction conditions were used in the hydrolysis of BRS AG rice. The hydrolysis reaction that led to the highest final glucose concentration (130.16 g/L) was performed with 1 h of liquefaction using Termamyl 2X, followed by saccharification with AMG 300 L for 3 h. The same reaction conditions were adopted with BRS AG rice hydrolysis and the glucose concentration obtained was 133.28 g/L. Different commercial strains of *S. cerevisiae* yeast, BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, were evaluated in fermentation reactions of rice hydrolyzates, performed in Shaker Orbital. The highest yields fermentation with commercial rice hydrolyzate were obtained by SA-1 yeasts, 93% yield and ethanol concentration of 58.92 g/L, and CAT-1, 92.7% yield and ethanol concentration of 58.93 g/L. For fermentations with giant rice hydrolyzate, highest yields were obtained by FT-858 yeast, 94.8% yield and ethanol concentration of 66.13 g/L, and CAT-1, yield 94.4 % and ethanol concentration of 65.85 g/L. After analyzed the fermentations results with different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast CAT-1 was used in the fermentations carried out in the reactor. The yield obtained for fermentation of commercial rice was 57.9% and for the giant rice 59.2%. These values were low compared to the fermentations carried out in erlenmeyers with this yeast for rice hydrolyzates in the Shaker Orbital stirring system. The volume occupied in the reactor with the respective rice hydrolyzates corresponded to 30% of the total volume. In contrast, 56% of the erlenmeyer total volume was filled with the hydrolyzates for the fermentations carried out in Shaker Orbital. In this way, higher amount of oxygen present in the reactor fermentations favored the cell growth, to the anaerobic fermentation, obtaining a lower ethanol yield. In addition, the values obtained for ethanol yield after fermentation of rices hydrolyzate were low compared to yield of efficient corn ethanol production plants. Thus, this work has as future prospects the optimization of

fermentation parameters, aiming to improve the process, obtaining higher ethanol yields, and lower co-product formation. As a preliminary study, the process of ethanol production from rice (BRS AG and commercial) was simulated with aid of Aspen Plus® software, allowing to establish operational conditions for determination of the mass balance of the process streams. Simulations results showed that there is a great potential of chemical processes simulators allied to the information obtained from fermentations carried out in laboratory scale.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. ETANOL COMBUSTÍVEL.....	4
3.1.1. Produção de Etanol no Brasil	6
3.1.2 Etanol de 2ª Geração	7
3.2. ETANOL DE AMIDO	8
3.2.1. Arroz como Matéria-prima	9
3.3. AMIDO	11
3.3.1 Amilose	13
3.3.2 Amilopectina	13
3.4. HIDRÓLISE DE BIOMASSAS AMILÁCEAS	15
3.5. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. REAGENTES	20
4.2. MÉTODOS.....	21
4.2.1. MOAGEM DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	21
4.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	21
4.2.2.1. Otimização do Processo de Hidrólise Enzimática	21
4.2.2.2. Hidrólise Enzimática das Amostras de Arroz Comercial e Arroz BRS AG.....	22
4.2.3. PREPARO DO MEIO DE CULTURA RICO YPG 10%.....	24
4.2.3.1. Meio de Cultura Líquido YPG 10%.....	24
4.2.3.2. Meio de Cultura Sólido YPG 10%.....	25
4.2.4. PREPARO DAS LEVEDURAS	25
4.2.4.1. Hidratação da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 Liofilizada	26

4.2.4.2. Preparo do Inóculo das Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no Meio de Cultura Rico	26
4.2.5. DETERMINAÇÃO PESO SECO DAS LEVEDURAS	28
4.2.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	29
4.2.6.1 Preparo de Soluções de Trabalho	30
4.2.6.2 Contagem de Células Viáveis de Leveduras.....	31
4.2.7. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E DE ARROZ GIGANTE	32
4.2.7.1. Fermentação em Erlenmeyer e Shaker Orbital	32
4.2.7.2. Reações de Fermentação Conduzidas no Sistema de Fermentação .	34
4.2.8. CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO.....	35
4.2.8.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto Etanol.....	35
4.2.8.2. Rendimento da Fermentação	36
4.2.8.3. Produtividade.....	36
4.2.8.4. Velocidade de consumo de substrato.....	36
4.2.9. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	38
5.1.1. Hidrólise Enzimática do Arroz Comercial e Arroz Gigante nas Condições Determinadas	42
5.2. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E ARROZ GIGANTE	44
5.2.1. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Comercial com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
5.2.2. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Gigante com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
5.2.3. Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação Dasgip Bioblock	57
5.2.3.1 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Comercial	57

5.2.3.2 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Gigante.....	60
5.2.3.3 Comparação das Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação com Hidrolisado de Arroz Comercial Centrifugado e não Centrifugado	62
5.2.3.4 Comparação das Fermentações com Hidrolisado de Arroz Gigante Centrifugado e não Centrifugado, conduzidas no Sistema de Fermentação. ..	65
6. SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE ARROZ COM ASPEN PLUS: AVALIAÇÃO PRELIMINAR	68
6.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ GIGANTE	70
6.2 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ COMERCIAL.....	75
7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	80
7.1 CONCLUSÕES	80
7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
8. BIBLIOGRAFIA 	88 



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de Etanol de 2007 a 2015. Adaptada. ¹⁵	5
Figura 2. Comparação dos grãos da cultivar de arroz convencional BRS Pampa (esquerda) com os grãos da cultivar BRS AG “Gigante” (direita). ⁹	11
Figura 3. Representação estrutural da amilose e da ligação α -(1-4)-glicosídica. Adaptada. ³⁹	13
Figura 4. Representação estrutural da amilopectina com ligação α -(1-4) e ligação α -(1-6)-glicosídica. Adaptada. ³⁹	14
Figura 5. A) Estrutura e classificação das cadeias da amilopectina em A, B e C. B) Amilopectina estruturalmente, formando regiões amorfas e cristalinas nos grânulos de amido. Adaptada. ³⁴	15
Figura 6. Representação do processo de fermentação alcoólica da glicose, levando a formação de duas moléculas de etanol e liberando dióxido de carbono. Adaptada. ⁵²	19
Figura 7. Arroz comercial (A) e arroz gigante (B) antes de passarem pelo moinho de facas tipo Willey Fortinox (C) e após moagem, (D, E), respectivamente.	21
Figura 8. Sistema reacional utilizado para as hidrólises enzimáticas do amido presente no arroz comercial e no arroz gigante BRS AG. Onde: (A) béquer com a mistura reacional (arroz previamente moído e tampão citrato de sódio), (B) placa de aquecimento, (C) homogeneizador.	24
Figura 9. Placa de Petri após crescimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1.	27
Figura 10. Gráficos de correlação de Peso seco de cada linhagem com a densidade ótica, onde: (A) levedura BG-1; (B) levedura CAT-1; (C) levedura FT-858; (D) levedura JP-1; (E) levedura PE-2; (F) levedura SA-1.....	29
Figura 11. Sistema utilizado para as reações de fermentação com as diferentes linhagens da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figura 12. Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.	35

Figura 13. Concentrações de glicose durante as reações de hidrólise enzimática do amido presente no arroz comercial.	39
Figura 14. Cromatogramas referentes as amostras das reações de hidrólise, com: A) 30 min de ação da Termamyl 2x; B) 1h de ação da Termamyl 2X; C) 2 h de ação da Termamyl 2X e D) 3 h de ação da Termamyl 2X.	41
Figura 15. Perfis de concentração de glicose durante a etapa de sacarificação, para as hidrólises com arroz comercial e arroz gigante.	42
Figura 16. Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial.	44
Figura 17. Perfis de concentração da produção de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, no hidrolisado de arroz comercial.....	46
Figura 18. Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial.	47
Figura 19. Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante.	51
Figura 20. Perfis de concentração de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante.	53
Figura 21. Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz gigante.	54
Figura 22. Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial.	58
Figura 23. Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz gigante.	60
Figura 24. Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado.	62
Figura 25. Curvas referentes a produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado.	63

Figura 26. Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado.	65
Figura 27. Curvas referentes a produção de glicerol para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado. ..	66
Figura 28. Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima.	69
Figura 29. Esquema simplificado do processo contínuo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima.	70
Figura 30. Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz gigante como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.	72
Figura 31. Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de etanol em 2016, segundo a <i>Renewable Fuel Association</i> (RFA). Adaptada. ¹⁵	5
Tabela 2. Composição aproximada do arroz branco polido. ²⁸	10
Tabela 3. Teor de amilose e amilopectina presentes em alguns amidos naturais. Adaptada. ³⁶	12
Tabela 4. Fermentações realizadas em erlenmeyer com as diferentes leveduras e hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.	32
Tabela 5. Reações enzimática realizadas para otimização do tempo no processo de hidrólise do amido presente no arroz.	38
Tabela 6. Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial com as diferentes linhagens da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , após 48 h de fermentação.	48
Tabela 7. Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante com as diferentes linhagens da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Tabela 8. Componentes químicos presentes no processo do modelo proposto com a utilização do Aspen Plus®.	68
Tabela 9. Fluxo de massa nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.	70
Tabela 10. Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.	71
Tabela 11. Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.	74
Tabela 12. Fluxo mássico nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.	75
Tabela 13. Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.	75
Tabela 14. Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.	77

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIações

ABS	Absorbância
AGUA	Corrente de saída de água
AGUAREP	Corrente de entrada de água de reposição
BG-1	Linhagem da Usina Barra Grande
BOMBA01	Bomba 01
BOTCOL01	Corrente do fundo da coluna de absorção 1
BOTCOL02	Corrente do fundo da coluna de absorção 2
BOTSEP01	Corrente de saída de fundo do separador 1
BOTSEP02	Corrente de saída de fundo do separador 2
CAT-1	Linhagem da Usina Catanduva (Ribeirão Preto)
CENT	Sistema de centrifugação
CIMA	Conselho Internacional do Açúcar e do Alcool
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
CO2	Corrente de saída de CO ₂
COL01	Coluna de absorção 1
COL02	Coluna de absorção 2
COL03	Coluna de absorção 3
COMP01	Compressor 1
DO	Densidade ótica
ETANOL	Corrente de saída de etanol
ENTSEP03	Corrente de entrada do separador 3
ENTT01	Corrente de entrada no trocador de calor 1

ENTT03	Corrente de entrada do trocador de calor 3
FT-858	Linhagem Selecionada pela Fermentec
H ₂ O-MUP	Corrente de entrada de água na coluna 3
JP-1	Linhagem da Destilaria Japungu (Paraíba)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIST01	Tanque de mistura 1
MIX01	Misturador 1
MIX02	Misturador 2
PE-2	Linhagem da Usina Pedra (Ribeirão Preto)
R (%)	Rendimento em porcentagem
R01	Reator 1
R02	Reator 2
RESIDUO	Corrente de saída do sistema de centrifugação
RFA	Renewable Fuels Association
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SA-1	Linhagem da Usina Santa Adélia (Pereira Barreto, SP)
SAICOMP1	Corrente de saída do compressor 1
SAIMIST	Corrente de saída do misturador 1
SAIMIX01	Corrente de saída do misturador 1
SAIMIX02	Corrente de saída do misturador 2
SAIR01	Corrente de saída do reator 1
SAIR02	Corrente de saída do reator 02
SAIT01	Corrente de saída do trocador de calor 1
SAIT02	Corrente de saída do trocador de calor 2
SAIT03	Corrente de saída do trocador de calor 3

SAIT04	Corrente de saída do trocador de calor 4
SAIT05	Corrente de saída do trocador de calor 5
SAIT06	Corrente de saída do trocador de calor 6
SEP01	Separador 1 (<i>Vaso Flash</i>)
SEP02	Separador 2 (<i>Vaso Flash</i>)
SEP03	Separador 03 (<i>Vaso Flash</i>)
T01	Trocador de calor 1
T02	Trocador de calor 2
T03	Trocador de calor 3
T04	Trocador de calor 4
T05	Trocador de calor 5
T06	Trocador de calor 6
TOPCOL01	Corrente do topo da coluna de absorção 1
TOPCOL02	Corrente do topo da coluna de absorção 2
TOPSEP01	Corrente de saída do topo do separador 1
TOPSEP02	Corrente de saída do topo do separador 2
TOPSEP03	Corrente do topo do separador 3
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto
YPG	Extrato de levedura, Peptona bacteriológica, glicose

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do século XX, o petróleo, o carvão e o gás natural tornaram-se a principal fonte de energia mundial e a principal base para a indústria química. Porém, tratam-se de recursos não renováveis, com forte impacto ambiental, responsáveis pela emissão de dióxido de carbono (CO₂), um dos principais gases do efeito estufa.¹ Além dos problemas ambientais e energéticos, com as mudanças climáticas globais já perceptíveis, a instabilidade política nos países exportadores de petróleo, bem como a escassez e a alta dos preços dos combustíveis fósseis fez com que o interesse internacional por combustíveis alternativos que possam substituir ou complementar o uso de combustíveis de origem fóssil aumentasse a cada ano.² Uma alternativa viável e bastante promissora à utilização dos recursos fósseis é o emprego do etanol como fonte de energia.³ Esse combustível já vem sendo utilizado como substituto da gasolina em motores de combustão há alguns anos.⁴

Atualmente, os Estados Unidos e o Brasil, são os maiores produtores de etanol combustível. Os Estados Unidos utilizam o amido do milho como fonte de carboidratos no processo fermentativo. Já o Brasil, utiliza a sacarose presente na cana-de-açúcar para obtenção de etanol.⁵

A produção industrial de etanol é feita por um processo fermentativo onde ocorre a conversão de açúcares em álcool, com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.⁶ Uma grande variedade de biomassas podem ser utilizadas no processo fermentativo, como por exemplo, milho, cana-de-açúcar e beterraba.⁴

Um elevado rendimento na produção de etanol é obtido ao se utilizar uma matéria-prima rica em amido.⁷ Biomassas vegetais amilácea, como milho, cevada, trigo, batata, batata-doce, mandioca e arroz mostram-se promissoras para a produção de etanol devido a sua viabilidade econômica e disponibilidade. Porém, a utilização dessas matérias-primas para fins energéticos pode afetar os preços dos produtos alimentícios.⁸ Visando evitar a concorrência de preços entre a indústria alimentícia e a produção de combustível, muitos estudos estão sendo realizados utilizando partes não comestíveis da planta, como por exemplo, palhas e talos, como matéria prima lignocelulósica na produção de etanol de 2^a geração.⁴

Outra alternativa para o uso de recursos naturais renováveis sem gerar uma competitividade com as indústrias de alimentos, é a obtenção de uma biomassa com fins exclusivos para a produção de etanol, como é o caso da cultivar de arroz BRS AG, desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado.⁹ Essa cultivar de arroz irrigado apresenta peso médio de mil grãos de 52 g, o que corresponde a aproximadamente o dobro do valor das cultivares convencionais de arroz irrigado no Brasil, cujo peso médio de mil grãos é de 25,6 g. Além disso, com relação ao potencial genético de produtividade, o arroz BRS AG apresenta rendimento médio de 8193 kg·ha⁻¹, valor próximo ao rendimento médio para o arroz BRS Pampa, que corresponde a 9215 kg·ha⁻¹. O arroz BRS AG apresenta grãos muito grandes, não são do tipo longos e finos, e possuem uma baixa relação de amilose-amilopectina, que resulta em uma qualidade inferior no cozimento, não se enquadrando nos padrões da indústria e do consumo brasileiro. Dessa forma, trata-se da primeira cultivar de arroz destinada à produção de etanol ou a alimentação animal, e não ao consumo humano.¹⁰

Com isso, realizou-se o estudo sobre o processo de hidrólise do amido presente no arroz BRS AG seguido da fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, avaliando-se o potencial de utilização dessa cultivar de arroz como biomassa amilácea para a produção de etanol. Os rendimento e produtividade obtidos foram comparados aos valores resultantes da hidrólise e fermentação com o arroz comercial BRS Pampa.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como principal objetivo a produção de etanol para fins energéticos utilizando como matérias-primas arroz comercial e a cultivar BRS AG (arroz gigante).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Otimizar as condições de hidrólise do amido presente no arroz comercial
- Avaliar diferentes leveduras industriais buscando o ótimo para a produção de etanol para o arroz comercial e para o arroz gigante (BRS AG)
- Efetuar um estudo comparativo arroz comercial e o arroz gigante (BRS AG) como matéria-prima para produção de etanol.
- Simular o processo de obtenção de etanol de arroz comercial e gigante (BRS AG) com o auxílio do simulador Aspen Plus.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ETANOL COMBUSTÍVEL

A utilização de biomassas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis, como por exemplo biodiesel, biogás e bioetanol, aumenta significativamente com o passar dos anos. Isso porque trata-se de um recurso renovável, de fácil obtenção e com baixo teor de enxofre, e conseqüentemente baixo impacto ambiental.¹¹

Além disso, no caso particular do uso de biomassa para obtenção de bioetanol, empregam-se, principalmente, biomassas com grandes quantidades de açúcares facilmente fermentáveis, como por exemplo, a cana-de-açúcar, ou com quantidades elevadas de amido, como por exemplo, o milho.¹² Materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas e florestais, também podem ser utilizados na produção de etanol de 2ª geração, porém, o rendimento de etanol obtido com esses materiais é menor em comparação com culturas de açúcar ou amido.¹³

O etanol pode ser obtido quimicamente, por meio da hidratação de etileno, ou por meio da ação de microrganismos. Atualmente, a principal rota industrial utilizada em todo o mundo para a produção de etanol combustível é por meio do processo microbiológico, chamado de fermentação alcoólica. Nesse processo, os açúcares são convertidos a etanol, energia, biomassa celular e CO₂, pelas células de levedura.¹⁴ A principal levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao alto rendimento final de etanol e elevada produtividade ao longo de todo o processo.¹¹

Com base em um levantamento realizado pela *Renewable Fuels Association* (RFA),¹⁵ a produção mundial de etanol cresceu nos últimos anos. A maior produção registrada desde 2007 a 2015 ocorreu em 2015, Figura 1, com aproximadamente 97.209.380 litros. Os Estados Unidos e o Brasil são hoje os maiores produtores de etanol combustível, responsáveis por mais de 85% da produção mundial.¹⁶

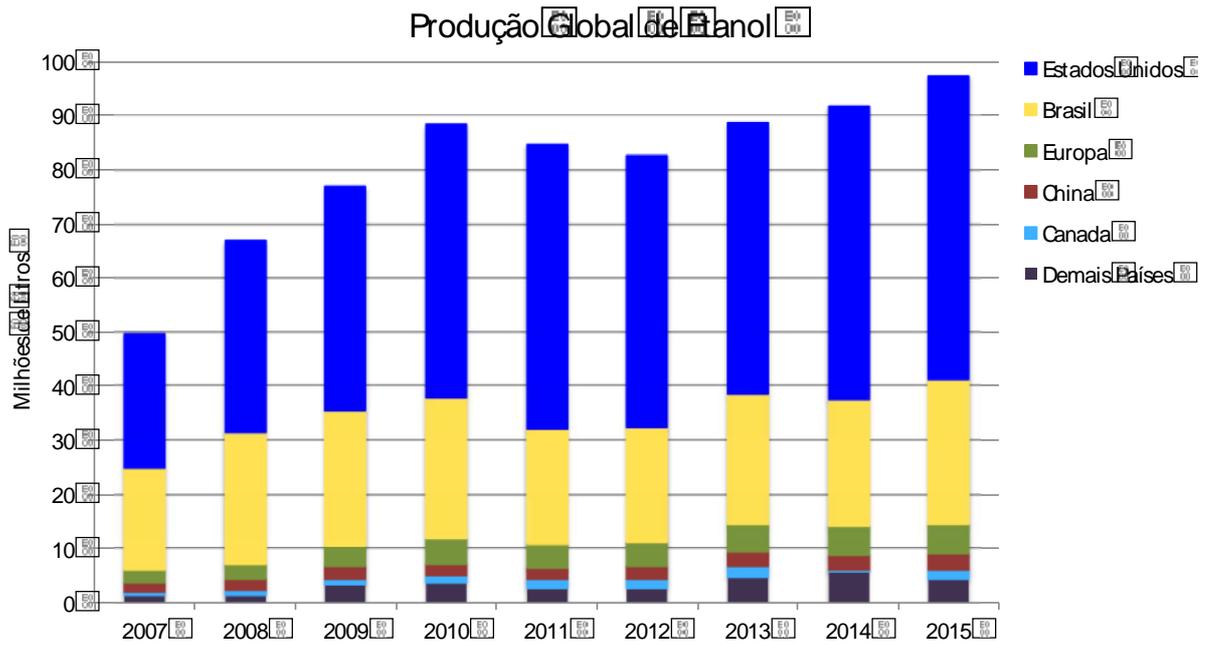


Figura 1. Produção mundial de Etanol de 2007 a 2015. Adaptada.¹⁵

Em 2016, os Estados Unidos produziram mais de 58.030 milhões de litros, e o Brasil mais de 27.615 milhões de litros.¹⁵ Entretanto, os Estados Unidos utilizam o amido presente no milho como fonte de carboidrato no processo fermentativo e o Brasil utiliza a sacarose presente na cana-de-açúcar para obtenção de bioetanol.⁵

Tabela 1. Produção mundial de etanol em 2016, segundo a *Renewable Fuel Association* (RFA). Adaptada.¹⁵

País	Produção de Etanol (Milhões de Litros)
Estados Unidos	58.030
Brasil	27.615
União Européia	5.213
China	3.199
Canadá	1.650
Tailândia	1.219
Argentina	999
Índia	852
Restante dos Países do Mundo	1.855

3.1.1. Produção de Etanol no Brasil

O Brasil é considerado pioneiro na produção e utilização de etanol biocombustível. O país utiliza a cana-de-açúcar como principal matéria-prima no processo fermentativo, no qual ocorre a conversão de açúcar à álcool por ação microbiana.¹⁷

A cana-de-açúcar foi inicialmente cultivada na região Nordeste do Brasil, pelos portugueses e rapidamente as plantações e usinas se expandiram pelo país. No século XVI, o açúcar era uma mercadoria importante de exportação para o mercado europeu. Em 1580, o país tornou-se o maior produtor de açúcar do mundo.¹⁸ Além do açúcar, a rapadura, a cachaça e o licor do suco da cana-de-açúcar fermentado eram as principais mercadorias oriundas dessa matéria-prima. Porém, em 1970 a cana-de-açúcar passou a ter um novo objetivo estratégico, ser utilizada na produção de etanol para substituir os derivados de petróleo.¹⁹

Fatores geográficos, políticos, climáticos e econômicos foram determinantes para que os primeiros centros de cultivo de cana-de-açúcar fossem em Pernambuco e na Bahia, porém, atualmente, a região Centro-Sul do Brasil é a maior produtora. O estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 60% da produção total, enquanto a região Nordeste só contribui com 11% da produção total de cana-de-açúcar.¹⁸

A crise do petróleo em 1970, fez com o que Brasil lançasse o programa Proálcool, em 1975, com o objetivo de diminuir a dependência existente em relação às importações de petróleo.¹⁴ Os incentivos gerados pelo Proálcool para a fabricação e utilização do etanol basearam-se em subsídios de preços, desenvolvimento tecnológico de motores movidos por este combustível e na combinação de fatores econômicos. Dentre os principais, destacam-se adição de etanol à gasolina, benefícios financeiros tanto para os consumidores quanto para os produtores rurais e incentivos fiscais para a compra e manutenção de veículos automotivos movidos a etanol.¹⁷

O surgimento de motores com combustível flex proporcionou ao consumidor o poder de escolha ao abastecer seu veículo, já que os carros flex podem funcionar com 100% de etanol hidratado ou com diferentes quantidades da mistura de etanol e gasolina. Os sensores eletrônicos detectam a mistura de combustível e ajustam de forma automática a combustão do motor.¹⁴

Conforme a Portaria N° 75, de 5 de março de 2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Resolução N° 1, de 4 de março de 2015, do Conselho Internacional do Açúcar e do Álcool (CIMA) o percentual obrigatório de etanol anidro combustível na gasolina comum é de 27%, desde 16 de março de 2015. Além disso, a produção de etanol da cana-de-açúcar é responsável por uma redução de 40% a 62% na emissão dos gases do efeito estufa, em relação à gasolina. Nos grandes centros urbanos, o emprego da mistura etanol e gasolina fez com que a emissão de monóxido de carbono diminuísse de 50 g/km para menos de 5,8 g/km.¹⁴

Para suprir a demanda de etanol combustível, é importante ressaltar que os avanços científicos e tecnológicos em microbiologia de fermentação contribuíram de forma significativa para a evolução da indústria de produção de etanol no Brasil. Um controle das condições de fermentação é vantajoso já que pode reduzir as condições de *stress* para as células de levedura, bem como diminuir a contaminação por bactérias.¹⁴

3.1.2 Etanol de 2ª Geração

O aproveitamento de resíduos agrícolas para produção de etanol de 2ª geração tem sido objeto de vários estudos, com o objetivo de agregar valor ao processo industrial de produção desse combustível, bem como utilizar matérias-primas que não sejam competitivas com a indústria alimentícia.⁴ Esses materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de hidratos de carbono, sendo potencialmente atraentes para as indústrias de etanol. A palha de arroz, por exemplo, é um subproduto bastante abundante no plantio de arroz, podendo ser utilizada como matéria prima de baixo custo na produção de bioetanol.²⁰

Biomassas lignocelulósicas são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose podem ser despolimerizadas a açúcares fermentáveis como a glicose, a hexose e a manose por meio de reações de pré-tratamento e hidrólise química ou hidrólise enzimática.²¹ No entanto, a produção de etanol a partir desses materiais apresenta alguns desafios. O alto consumo de energia, bem como a necessidade de equipamentos especiais restringem o processo de pré-tratamento desses materiais, no qual deseja-se remover a lignina

que une os polímeros de carboidratos. Durante a etapa de sacarificação, utiliza-se um complexo enzimático de celulases que, muitas vezes, encarece o processo.²²

Nos últimos anos, vários métodos físicos e químicos foram desenvolvidos para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica visando à obtenção de açúcares fermentáveis. Porém, a maioria desses métodos necessita de alta temperatura, alta pressão ou quantidades elevadas de produtos químicos, que podem ser tóxicos para as enzimas e microrganismos fermentativos. O método físico mais utilizado é a explosão a vapor e, em escala laboratorial o microondas. O pré-tratamento químico ocorre com o emprego de ácidos diluídos em reações de hidrólise ácida com alta temperatura.²² Entretanto, formam-se compostos inibidores com concentrações relativamente elevadas, incluindo o furfural hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, ácido fórmico, ácidos levulínicos e vanilina. Esses inibidores desfavorecem o crescimento microbiano, o metabolismo e a produção de etanol combustível. A remoção desses compostos inibidores requer etapas subsequentes de purificação (remoção de inibidor), o que aumenta o tempo do processo e eleva os custos de produção, podendo ser economicamente inviável para a indústria de bioetanol.²⁰

Contudo, o aproveitamento de materiais lignocelulósicos pode ser vantajoso, uma vez que no Brasil, grandes quantidades desses materiais provenientes da cana-de-açúcar são descartados como lixo residual, que podem ser utilizados para aumentar a produtividade e agregar valor ao etanol combustível. Como essas biomassas já estão disponíveis na cana-de-açúcar, a produção de etanol de segunda geração pode utilizar parte da infraestrutura requerida na produção de etanol de primeira geração.⁵

3.2. ETANOL DE AMIDO

A produção de etanol combustível a partir de biomassas que apresentam em sua composição grande quantidade de amido têm se mostrado bastante eficiente.⁷ Alguns países da Europa, América do Norte e Ásia Central já estão utilizando essas matérias-primas para fins energéticos. Isso porque, regiões de clima temperado são favoráveis ao plantio e cultivo de biomassas amiláceas, como por exemplo, milho, mandioca e batata-doce.³

O milho é a biomassa amilácea mais utilizada na produção de bioetanol. Seus grãos são constituídos por aproximadamente 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4 % de óleo.²³ Atualmente, os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol combustível e utilizam o milho como matéria-prima. Só em 2016, o país foi responsável por aproximadamente 58% da produção mundial de etanol.¹⁶

A mandioca é um tubérculo rico em amido, com forte potencial para uso nas indústrias sucroalcooleiras. Uma das vantagens associada ao emprego desse tubérculo está no plantio. As destilarias à base de açúcar são sazonalmente operadas, em contrapartida, as usinas que utilizam a mandioca como matéria-prima, podem ser operadas durante todo o ano devido ao rápido crescimento.⁷ O Vietnã é um dos produtores de etanol a partir do amido presente na mandioca. Até 2010, o país possuía 8 usinas de etanol, com capacidade máxima de produção de 680 milhões de litros por ano. Desse total, 62% com fins exclusivos para biocombustíveis, e o restante distribuídos para as indústrias alcoólicas, farmacêuticas, cosméticas e para exportação.²⁴

Outro tubérculo que apresenta grande quantidade de amido é a batata doce. Sua boa adaptabilidade a diferentes altitudes e tipos de solo atrelado aos baixos custos necessários para o plantio e colheita, tornam-na atrativa para ser adotada como matéria prima nas indústrias de bioetanol.²⁵ A China utiliza a batata doce como principal biomassa na produção de etanol combustível já que o país é responsável por cerca de 85% da produção mundial desse tubérculo.²⁶ Por ano, o país produz mais de 100 milhões de toneladas de batata doce.²⁷

3.2.1. Arroz como Matéria-prima

O arroz é um grão com potencial para utilização como biomassa na produção de etanol devido a grande quantidade de amido presente em sua composição. Atualmente, o arroz constitui a base da dieta diária de mais da metade da população mundial, sendo fonte de vitaminas e minerais.²⁸ Anualmente, estima-se que a produção global de arroz seja cerca de 480 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 4,4 toneladas por hectare e uma área colhida de aproximadamente 160 milhões de hectares.²⁹ A Ásia é responsável por 80% do cultivo global.³⁰ O Brasil é o maior produtor de arroz fora da Ásia, e o 9º maior produtor mundial. Em 2015, o país produziu em média 12,5 milhões de toneladas,

sendo que 8,7 milhões de toneladas foram produzidas no estado do Rio Grande do Sul. A região possui clima e solos hidromórficos ideais para o cultivo do arroz irrigado, sendo responsável pelo cultivo de 1,1 milhões de hectares por ano.³¹

O arroz constitui uma fonte importante de carboidratos por possuir grande quantidade de amido em sua composição, além de conter quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas.²⁹ Fatores genéticos, ambientais, variações de manejo, processamento e de armazenamento fazem com que a composição do grão e de suas frações sofram variações. Estudos apontam que a concentração de amido no arroz integral de diferentes cultivares varia de 72% a 82%.³² O percentual de amido presente em grãos de arroz branco polido é de aproximadamente 90%.²⁸ O arroz parboilizado polido possui cerca de 85% de amido.³² A Tabela 2 apresenta os componentes presente no arroz branco polido com suas devidas porcentagens.

Tabela 2. Composição aproximada do arroz branco polido.²⁸

Componentes	% (m/m)
Amido	90
Proteínas	7,5
Fibras	0,6
Minerais	0,5

A utilização do arroz para produção de etanol pode afetar significativamente no preço comercial desse grão nas indústrias alimentícias. Com objetivo de evitar a concorrência entre esses dois setores, combustível e alimento, a Embrapa Clima Temperado, localizada na região Sul do Brasil, desenvolveu um arroz exclusivamente para a produção de álcool de cereais e para alimentação animal.^{9, 10} Trata-se da cultivar BRS AG, também chamado arroz gigante devido ao tamanho dos grãos. A cultivar BRS AG é resultante de um cruzamento simples, que envolveu como genitores a cultivar americana Gulfmont de arroz irrigado e a linhagem *super large grain* (SLG1) de origem japonesa.³³ Trata-se da primeira cultivar de arroz irrigado desenvolvida para outros fins, e não consumo humano. Isso porque seus grãos não são do tipo longos e finos, são muito grandes e possuem baixa relação de amilose-amilopectina, (polissacarídeos presentes no amido), que resulta em uma

qualidade inferior no cozimento, não se enquadrando nos padrões da indústria e do consumo brasileiro. O alto teor de amilose ocasiona aglutinação dos grãos após o processo de cocção. Com isso, o arroz gigante é denominado Desclassificado para Consumo Humano (DCH). O ciclo biológico, da emergência à maturação é em torno de 126 dias, a altura média das plantas é de 110 cm e a espessura do colmo é de 5,5 mm, o que lhe confere colmos fortes e resistentes ao acamamento. O peso médio de mil sementes é de 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresenta peso médio de 25,6 g. Seus grãos são extremamente farináceos, e sua produtividade é superior a 12 toneladas por hectare, o que corresponde a quase o dobro das cultivares tradicionais. Além da alta produtividade, e da não utilização na alimentação humana, seus grãos possuem grande quantidade de amido, tornando-o bastante atrativo para produção de bioetanol.^{9, 10}



Figura 2. Comparação dos grãos da cultivar de arroz convencional BRS Pampa (esquerda) com os grãos da cultivar BRS AG “Gigante” (direita).⁹

3.3. AMIDO

O amido é o carboidrato de reserva energética mais comum nas plantas e um dos principais produtos agroindustriais. Anualmente, são produzidos cerca de 2 bilhões de toneladas de amido a partir de cereais.²⁹ Além disso, é a fonte de carboidratos mais importante e presente na alimentação humana, correspondendo de 80% a 90% de todos os polissacarídeos consumidos.³⁴

Em grãos de cereais, o amido corresponde de 40% a 90% do peso seco, em leguminosas de 30% a 50% do peso seco, em tubérculos de 65% a 85 do peso seco e em frutas ainda não maduras de 40% a 70% do peso seco.³⁴

Estruturalmente, trata-se de um polímero constituído por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina, com unidades de α -D-glicose unidas sucessivamente.³⁵ As proporções desses polissacarídeos diferem em relação ao tipo de planta, variedades de uma mesma espécie e de acordo com seu grau de maturação.³⁴ A Tabela 3 apresenta a porcentagem de amilose e amilopectina de algumas fontes vegetais.

Tabela 3. Teor de amilose e amilopectina presentes em alguns amidos naturais. Adaptada.³⁶

Fonte Vegetal	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Milho	25	75
Batata	23	77
Arroz	15 - 25	75 - 85
Trigo	20	80
Mandioca	16 - 20	80 - 84
Inhame	30	70
Aveia	16 - 33	67 - 84

O amido é depositado nas plantas em forma de grânulos, cujas dimensões e formato podem variar de acordo com a espécie vegetal. O diâmetro desses grânulos pode estar entre menos de 1 μ m a mais de 100 μ m e seu formato pode ser angular, oval, redondo, esférico ou irregular.²⁹ Além disso, os grânulos de amido possuem caráter semicristalino, ou seja, apresentam regiões cristalinas e regiões menos amorfas, e apresentam birrefringência quando em solução aquosa e observados em microscópio óptico sob luz polarizada.³⁶ Possuem um centro, também chamado de “hilum”, considerado o ponto original de crescimento do grânulo.³⁴

O amido além de ser fonte de carboidrato na alimentação humana e animal, é utilizado como matéria prima nas indústrias têxtil, na produção de materiais termoplásticos biodegradáveis, bem como na produção de fármacos. Além disso, é utilizado nas indústrias como espessante, estabilizador de coloides, agente gelificante e de volume, adesivo, entre outras aplicações.³⁴

3.3.1 Amilose

A amilose é um polímero com cadeia linear, constituída por várias moléculas de α -glicose unidas por meio de ligações α -1,4-glicosídicas. Porém, pode possuir algumas ligações α -1,6-glicosídica, mas como suas ramificações são separadas por longas distâncias, suas propriedades são as de uma molécula linear.³⁷ A maioria dos amidos contem de 20% a 25% de amilose na sua composição.³⁸ Entretanto, alguns cereais denominados cerosos podem não possuir amilose, como por exemplo, milho ceroso.³⁴

As moléculas de amilose possuem aproximadamente massa molecular entre 10^5 e 10^6 , número médio de grau de polimerização de 324 a 4920 unidades de glicose, com 9 a 20 pontos de ramificação, o que equivale de 3 a 11 cadeias por molécula. A estrutura e o tamanho da amilose diferem de acordo com a origem botânica.³⁷

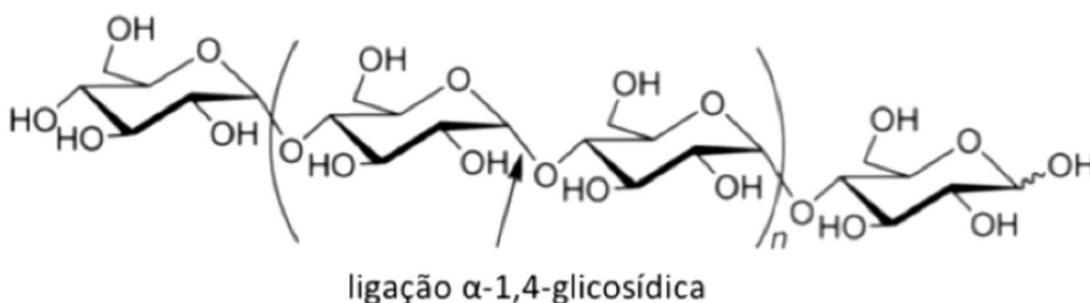


Figura 3. Representação estrutural da amilose e da ligação α -(1-4)-glicosídica. Adaptada.³⁹

3.3.2 Amilopectina

A amilopectina é um polissacarídeo ramificado, formada por unidades de α -glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas, e ramificações provenientes de ligações α -1,6-glicosídicas.³⁹ Comparando com a amilose, a amilopectina é uma molécula muito maior, com massa molecular entre 10^7 a 10^9 , e com muitas ramificações. A sua estrutura molecular possui aproximadamente 95% de ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) e 5% de ligações α -(1 \rightarrow 6). Possui grau de polimerização entre 9600 a 15.900 unidades de glicose, e assim como a amilose, a estrutura molecular, a forma e o tamanho variam de acordo com a origem botânica.³⁷

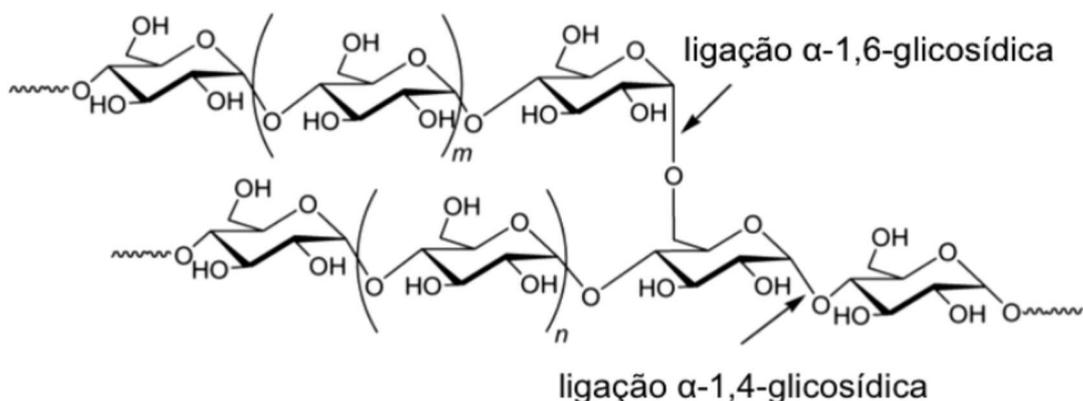


Figura 4. Representação estrutural da amilopectina com ligação α -(1-4) e ligação α -(1-6)-glicosídica. Adaptada.³⁹

Estruturalmente, a parte linear das moléculas da amilopectina, resultante das ligações α -(1 \rightarrow 4), forma estruturas helicoidais duplas, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas, levando a formação de regiões cristalinas. Porém, os grânulos de amido também apresentam regiões amorfas, constituídas pelas ramificações da amilopectina, resultante das ligações α -(1 \rightarrow 6), e pelas cadeias da amilose.³⁶

As cadeias da amilopectina são organizadas e classificadas de três formas, A, B e C, conforme Figura 5. A classificação tipo A, é composta por uma cadeia não redutora de glicose, unidas por meio de ligações α -(1 \rightarrow 4). Estas por sua vez, são unidas a uma cadeia tipo B por meio de ligações α -(1 \rightarrow 6). As cadeias tipo B são compostas por unidades de glicose ligadas em posições α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6), possuindo uma ou mais cadeias do tipo A e podendo conter cadeias do tipo B unidas por meio de um grupo hidroxila. Por fim, uma molécula de amilopectina possui apenas uma cadeia C, comporta por ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6), com um grupamento terminal redutor.³⁴

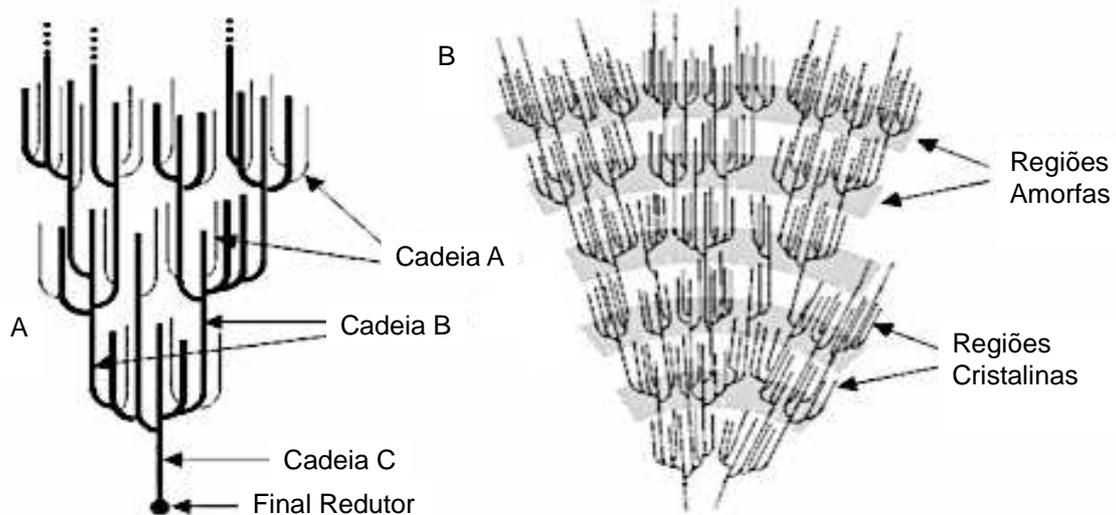


Figura 5. A) Estrutura e classificação das cadeias da amilopectina em A, B e C. B) Amilopectina estruturalmente, formando regiões amorfas e cristalinas nos grânulos de amido. Adaptada.³⁴

A amilopectina está presente em todos os grânulos de amido, sendo responsável por aproximadamente 75% da sua composição. Normalmente, é o polissacarídeo predominante e em alguns casos, é o único componente presente no amido (amido ceroso).⁴⁰

3.4. HIDRÓLISE DE BIOMASSAS AMILÁCEAS

A produção de etanol combustível a partir de matérias primas amiláceas requer que uma etapa de hidrólise do amido à açúcares monoméricos fermentáveis anteceda a fermentação.⁴¹

A hidrólise pode ser feita por processo químico ou biológico. A escolha em realizar a hidrólise do amido quimicamente, com a utilização de ácidos inorgânicos diluídos, ou biologicamente, com emprego de enzimas, é realizada levando-se em consideração vantagens e desvantagens associadas a cada processo.⁴²

A utilização de ácidos inorgânicos, como por exemplo, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, possui como vantagens elevadas velocidades de reação, pré-tratamento simples das matérias-primas amiláceas, utilização de um catalisador ácido facilmente disponível e de baixo custo. As desvantagens existentes perante

essa hidrólise são as condições drásticas de reação (pH e temperatura), o possível efeito inibitório dos subprodutos no crescimento celular das leveduras, a neutralização de hidrolisado antes da fermentação, e a utilização de materiais e equipamentos resistentes a ácidos.⁴²

A hidrólise enzimática possui como principais vantagens as condições brandas de reação, inerente a ausência de reações secundárias, e a especificidade das enzimas, proporcionando a formação de produtos com propriedades químicas e físicas mais definidas.⁴² Além disso, as enzimas são compostos naturais, biodegradáveis e que não ocasionam danos ambientais.⁴³ No entanto, o custo das enzimas, bem como os requisitos para mão-de-obra especializada e laboratórios bem equipados são algumas desvantagens inerentes a esse processo.⁴² Porém, mesmo diante a esses fatores adversos, as amilases, enzimas catalisadoras no processo de hidrólise do amido, são mais utilizadas em comparação aos ácidos inorgânicos.⁷

A conversão do amido em açúcares fermentáveis ocorre em três etapas. Primeiramente, 20% a 40% do amido é gelatinizado a temperatura de aproximadamente 100 °C por cerca de 5 a 10 minutos.⁴¹ A etapa seguinte corresponde a liquefação do amido por meio da utilização de uma enzima termoestável, a α -amilase.³ Essa enzima é obtida a partir de bactérias termo-resistentes como a *Bacillus licheniformis* ou por meio de cepas modificadas de *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*.⁷ A α -amilase é uma endoamilase, ou seja, trata-se de uma enzima capaz de clivar as ligações α -1,4- glicosídicas da amilose e da amilopectina em posições internas (endo), levando a formação de oligossacarídeos com diferentes comprimentos e oligossacarídeos ramificados, chamados dextrinas.⁴⁴ As ligações α -1,4 são clivadas de forma aleatória. Nessa etapa, a suspensão deve ser mantida a uma elevada temperatura, de 90 °C a 110 °C para quebra das moléculas de amido.⁷

A terceira etapa consiste na sacarificação dessas dextrinas, levando a obtenção de açúcares monoméricos, glicose.³ Esta reação é catalisada pelas exoamilases, como a amiloglucosidase, que é capaz clivar as ligações α -1,4 e α -1,6- glicosídicas nos pontos de ramificação, liberando unidades de β -D-glicose do substrato polimérico.⁴⁴ Nessa etapa, a maltotriose e a maltose são hidrolisadas a uma taxa mais baixa em comparação as cadeias maiores de oligossacarídeos. Além

disso, as ligações α -1,6-glicosídicas são clivadas mais lentamente do que as ligações α -1,4-glicosídicas.^{45,46} As amiloglucosidases são geralmente obtidas a partir de *Aspergillus niger* ou *Rhizopus species*.⁷ A reação de sacarificação ocorre normalmente a 60 °C, visto que essa é a temperatura ideal de atividade da amiloglucosidase, levando a uma maior conversão de glicose, e posterior maior rendimento de etanol.¹²

3.5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um conjunto de reações bioquímicas no qual microrganismos atuam na transformação de açúcares à etanol e dióxido de carbono (CO₂).¹⁴ A presença de açúcar, a utilização de microrganismos capazes de atuar na transformação de açúcar à etanol e dióxido de carbono e a ausência de oxigênio são fatores fundamentais os quais interferem no rendimento final da fermentação.¹⁹ Entre vários microrganismos já explorados para a produção de etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se, já que proporciona uma fermentação uniforme, com elevado rendimento final de etanol e alta produtividade ao longo do processo.¹¹

A produção de bioetanol a partir do processo fermentativo depende de fatores como temperatura, pH, concentração de açúcar, tempo de fermentação, taxa de agitação.¹⁶ A temperatura ótima produtiva da *S. cerevisiae* é de 26 °C a 35 °C. O aumento da temperatura pode levar a uma contaminação bacteriana, que pode resultar na floculação, na redução da viabilidade celular das leveduras, e na diminuição do rendimento do processo. Uma contaminação bacteriana com concentração superior a 10⁷ unidades formadoras de colônias por mL pode resultar em uma redução de 1% a 5% do rendimento do processo.⁴⁷

A escolha de qual microrganismo utilizar na fermentação alcoólica em escala industrial deve ser feita levando-se em consideração sua capacidade de converter o substrato em produto em um menor tempo, com altos rendimentos de etanol e produtividade, bem como menor formação de coprodutos, como por exemplo, ácido acético.⁴⁸ A estabilidade do agente biológico diante as condições reacionais como elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura e elevada força iônica e a capacidade de ser resistente a substâncias tóxicas que podem ter sido geradas no

processo de tratamento da matéria-prima ou que estejam presentes em resíduos e efluentes são fatores que também devem ser levados em consideração.⁴⁹

Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se obter outro microrganismo capaz de produzir etanol com algumas vantagens diante a *S. cerevisiae*. Nesse contexto, a bactéria *Zymomonas mobilis* mostra-se bastante promissora, porém a levedura *S. cerevisiae* ainda é a mais utilizada.⁵⁰

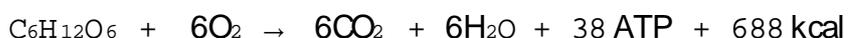
A principal via metabólica envolvida no processo fermentativo é a glicólise, onde uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são formadas, liberando hidrogênio e energia na forma de ATP. Quando a fermentação ocorre em condições anaeróbicas (ausência de oxigênio), o piruvato é reduzido a etanol, com a liberação de CO₂ e formação de duas moléculas de ATP.⁵⁰

De acordo com a equação de Gay-Lussac para essa etapa de glicólise, onde 1 mol de glicose (180 g) produz 2 mols de etanol (92 g), 2 mols de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia. Em condições aeróbicas (presença de oxigênio), ocorre um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde é oxidado a dióxido de carbono e água.⁵¹

Equação Gay-Lussac:



Ciclo de Krebs:



Dessa forma, o rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g_{etanol}/g_{glicose} (51%). A formação de coprodutos, como glicerol e álcoois superiores, necessários para a síntese de material celular e manutenção da levedura, faz com que, na prática, não se obtenha esse valor para o rendimento de etanol.⁵¹

A primeira etapa da fermentação alcoólica corresponde a fosforilação do açúcar. Caso o açúcar presente seja a glicose ou a frutose, a fosforilação ocorre por meio das enzimas hexoquinase. A enzima glucoquinase fosforila somente a glicose. Os açúcares fosforilados são metabolizados, levando a formação de duas moléculas

de piruvato, via glicólise. O piruvato por sua vez, é descarboxilado a acetaldeído por meio da enzima piruvato descarboxilase, e, em seguida, reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase.⁴⁹

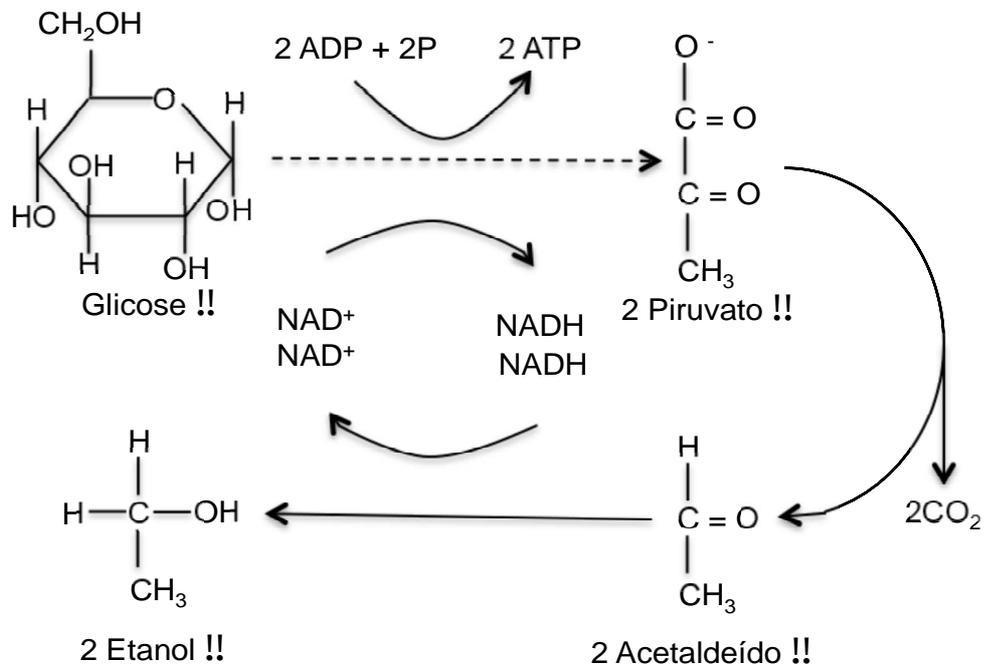


Figura 6. Representação do processo de fermentação alcoólica da glicose, levando a formação de duas moléculas de etanol e liberando dióxido de carbono. Adaptada.⁵²

Durante o processo fermentativo, ocorre o crescimento de células de levedura. Isso porque duas moléculas de ATPs produzidas na glicólise são utilizadas para conduzir a biossíntese celular das leveduras. Dessa forma, a levedura produzida é um coproduto associado a produção de etanol. Outros subprodutos também podem ser produzidos durante a fermentação do etanol e, entre eles, o glicerol é o principal. Alguns fatores como pH elevado e pressão osmótica elevada podem estimular a formação desses subprodutos. A formação desses subprodutos e o crescimento de células da levedura utilizada podem diminuir o rendimento final de etanol.⁵⁰

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

As reações de hidrólise enzimática das amostras de arroz comercial e arroz BRS AG foram realizadas em meio tamponado. Na solução tampão 0,1 M de citrato de sódio, pH 5,5 foram utilizados: ácido cítrico, grau P.A.; citrato de sódio dihidratado, com pureza P.A.; e água destilada.

A hidrólise do amido presente nas amostras de arroz foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, referente a liquefação, utilizou-se a enzima α -amilase Termamyl 2X, fornecida pela Novozymes. Posteriormente, utilizou-se a enzima amiloglucosidase AMG 300 L, fornecida pelas Novozymes, para a sacarificação e obtenção da glicose.

Preparou-se o meio de cultura para crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando: peptona bacteriológica; extrato de levedura em pó; D(+) glicose anidra, grau de pureza P.A.; agar; água destilada.

A quantificação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* do meio de cultura foi feita empregando-se a Câmara de Neubauer, sendo necessário o preparo de algumas soluções. Para a solução tampão fosfato, os reagentes usados foram: fosfato de sódio monobásico anidro, 98% P.A.; fosfato de sódio bibásico, grau de pureza 98,5%; água destilada estéril. A solução estoque de eritrosina foi preparada com eritrosina e água destilada estéril.

Para a quantificação da glicose obtida após reação de hidrólise, bem como quantificação dos produtos da fermentação, análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas no equipamento Infinity 1260 Agilent Technology, com coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (BioRad). A fase móvel para essa coluna cromatográfica corresponde uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, preparada em capela de exaustão, com ácido sulfúrico com grau de pureza 97,8%, e água destilada purificada em um sistema Milli-Q. A cada utilização do equipamento CLAE para quantificação de açúcares ou etanol, eram preparados 2 L de solução de ácido sulfúrico. A solução era transferida para um frasco reagente de 2 L, e submetida à ultrassom no equipamento Banho Ultrassônico, por 15 minutos para desgaseificação da solução.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. MOAGEM DAS MATÉRIAS-PRIMAS

As amostras de arroz comercial BRS Pampa e arroz da cultivar BRS AG, foram moídas em Moinho de Facas tipo Willey Fortinox Star FT-60, com tamanho granulometria de $696,8 \pm 25,4 \mu\text{m}$.

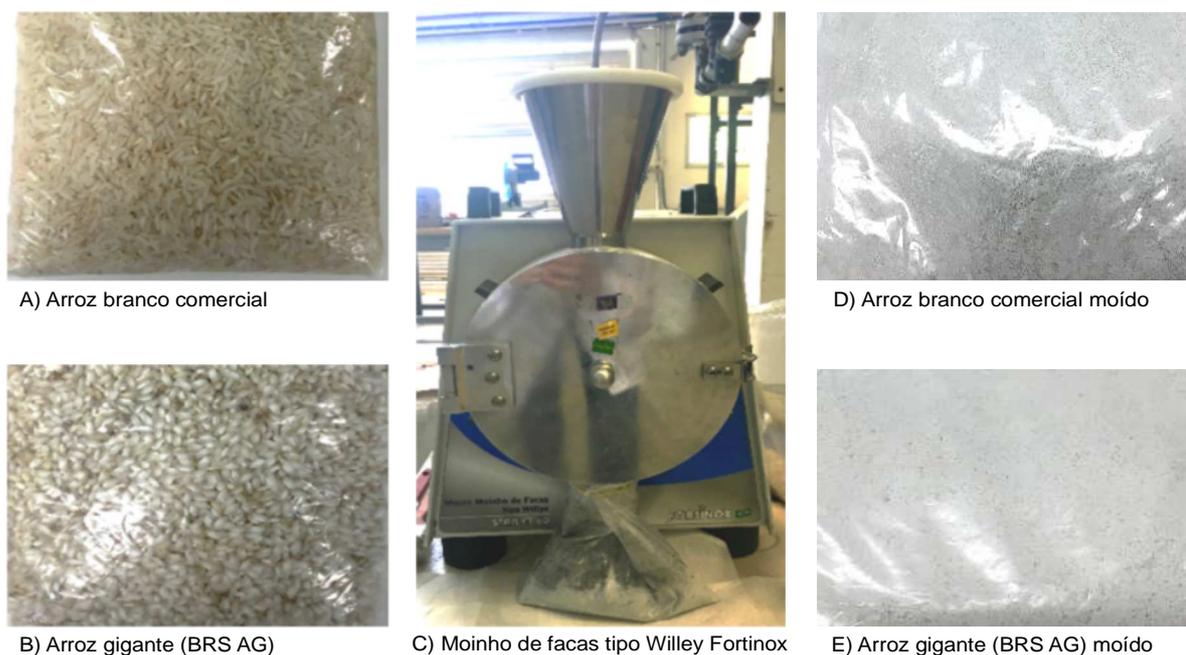


Figura 7. Arroz comercial (A) e arroz gigante (B) antes de passarem pelo moinho de facas tipo Willey Fortinox (C) e após moagem, (D, E), respectivamente.

4.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

4.2.2.1. Otimização do Processo de Hidrólise Enzimática

O presente trabalho propôs uma otimização do processo de hidrólise enzimática do amido contido no arroz comercial, para posterior utilização da melhor condição reacional nas reações de hidrólise do arroz comercial e do arroz gigante (BRS AG) para reações de fermentação com a levedura *S. cerevisiae*.

As reações de hidrólise do amido presente nas amostras de arroz comercial foram realizadas em meio tamponado e em um Sistema de Fermentação da marca Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock.

Primeiramente, preparou-se a solução tampão citrato de sódio 0,1 M com pH 5,5. A concentração de interesse de amido na solução do tampão com o arroz moído era de 120 g/L, assumindo que a quantidade de amido presente no arroz comercial é de aproximadamente 80%. A mistura foi transferida ao frasco reator. O sistema foi então aquecido a uma temperatura de 90 °C e colocado sob agitação. Ao atingir a temperatura, adicionou-se ao frasco reator a enzima Termamyl 2X, 10 vezes em excesso em relação a dosagem recomendada pelo fabricante Novozyme.

O tempo de ação da α -amilase na etapa de liquefação do amido variou conforme cada reação de hidrólise, com o objetivo de conhecer as melhores condições reacionais para o processo. Informações do fabricante das enzimas (Novozymes) foram adotadas para os fatores temperatura e pH do meio.⁵³ Realizou-se uma reação de hidrólise na qual essa enzima não foi utilizada, bem como hidrólises nas quais a enzima Termamyl 2X atuou por 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas.

Transcorrido o tempo de ação da enzima, corrigiu-se o pH da mistura para 4,5 com a adição de uma solução de ácido cítrico 1 M, e esperou-se o sistema resfriar e atingir uma temperatura de 60 °C, visto que essas são as condições ótimas de ação da amiloglicosidase.⁵⁴ Adicionou-se a enzima AMG 300 L, 10 vezes em excesso em relação a dosagem recomendada pelo fabricante Novozyme, e a reação de sacarificação transcorreu por mais 3 horas. A melhor condição reacional foi determinada levando-se em consideração a quantidade final de glicose, conforme quantificação por CLAE.

4.2.2.2. Hidrólise Enzimática das Amostras de Arroz Comercial e Arroz BRS AG

As reações de hidrólise do amido presente nas amostras de arroz comercial e arroz gigante previamente moídos foram realizadas em meio tamponado. Inicialmente, preparou-se uma solução de citrato de sódio 0,1 M e uma solução de ácido cítrico 0,1 M. Com a utilização do pHmetro, determinou-se o pH da solução de citrato de sódio, e adicionou-se lentamente, a solução de ácido cítrico 0,1 M, até

obtenção do pH 5,5. As hidrólises enzimáticas das amostras de arroz comercial e arroz BRS AG foram realizadas separadamente, porém seguindo o mesmo procedimento.

A concentração de amido desejada na mistura do tampão citrato de sódio com cada arroz moído era de 120 g/L, assumindo que a quantidade de amido presente em ambos os arrozes é de aproximadamente 80%, ou seja, em 100 g de arroz 80 g é amido. Dessa forma, adicionou-se, a um béquer previamente tarado o arroz moído e a solução tampão 0,1 M de citrato de sódio, com pH 5,5. Montou-se um sistema com placa de aquecimento com controlador de temperatura e homogeneizador (Figura 8). Sob a placa de aquecimento colocou-se o béquer com a solução de arroz e tampão citrato de sódio. A mistura foi aquecida até a temperatura de 90 °C, sob agitação. Ao atingir essa temperatura, adicionou-se a enzima Termamyl 2x em excesso, para atuação na liquefação do amido. Transcorrido o tempo de ação dessa α -amilase, corrigiu-se o pH das misturas para 4,5 com a adição de uma solução de ácido cítrico 1 M, e esperou-se a temperatura diminuir para 60°C, visto que essas são as condições ótimas de ação da amiloglicosidase.⁵⁴ Adicionou-se a enzima AMG 300 L em excesso, ao sistema e a reação de sacarificação transcorreu por mais 3 horas. Amostras retiradas a cada uma hora de reação da hidrólise foram posteriormente analisadas por CLAE, para quantificação da glicose final obtida.



Figura 8. Sistema reacional utilizado para as hidrólises enzimáticas do amido presente no arroz comercial e no arroz gigante BRS AG. Onde: (A) béquer com a mistura reacional (arroz previamente moído e tampão citrato de sódio), (B) placa de aquecimento, (C) homogeneizador.

4.2.3. PREPARO DO MEIO DE CULTURA RICO YPG 10%

4.2.3.1. Meio de Cultura Líquido YPG 10%

Preparou-se o meio de cultura líquido YPG 10% para posterior crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Utilizou-se 10 g/L (1%) de extrato de levedura, 20 g/L (2%) de peptona bacteriológica e 20 g/L (2%) de glicose. Inicialmente, solubilizou-se a

glicose em água destilada, para posterior adição dos demais reagentes e homogeneização. A mistura foi transferida para erlenmeyers de vidro de 1000 mL. Os erlenmeyers foram tampados com buchas de algodão, gaze e barbante.

4.2.3.2. Meio de Cultura Sólido YPG 10%

No preparo do meio de cultura sólido, para posterior crescimento da levedura *S. cerevisiae* em placas de Petri, utilizou-se: 10 g/L (1%) de extrato de levedura; 20 g/L (2%) de peptona bacteriológica; 20 g/L (2%) de glicose; 20 g/L (2%) de agar e água destilada. Primeiramente, solubilizou-se a glicose em água destilada, para posterior adição dos demais reagentes. A mistura foi homogeneizada e transferida para um frasco reagente semiaberto.

Os erlenmeyers com o meio de cultura líquido e o frasco reagente com o meio de cultura sólido foram autoclavados a 121 °C, 1 atm por aproximadamente 30 minutos. Transcorrido esse tempo, esperou a autoclave resfriar para então despressurizá-la para abertura. Assim que a autoclave foi aberta, tampou-se o frasco reagente e vedou-se melhor os erlenmeyers, para evitar contaminação. O meio de cultura sólido YPG 10% do frasco reagente foi vertido nas placas de Petri, em meio estéril, na capela de fluxo laminar.

4.2.4. PREPARO DAS LEVEDURAS

Diferentes linhagens comerciais de leveduras da espécie *S. cerevisiae* foram avaliadas durante processo fermentativo com o objetivo de se determinar qual microrganismo seria mais apropriado para o processo. As cepas utilizadas nesse estudo foram: BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, uma vez que tratam-se das leveduras comerciais mais utilizadas no Brasil. A levedura CAT-1 encontrava-se liofilizada, sendo necessário que uma etapa de hidratação dessa levedura antecederesse seu inóculo no meio de cultura rico YPG 10%. As demais leveduras foram retiradas do banco de trabalho da Embrapa Agroenergia, e encontravam-se criopreservadas a -80 °C, em glicerol 20% e YPG, e estavam armazenadas em tubos tipo eppendorf.

4.2.4.1. Hidratação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 Liofilizada

Em um béquer de 10 mL, pesou-se 0,1 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, adicionou-se pequena quantidade de água destilada e misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 25 mL e avolumou-se até o menisco com água destilada. A mistura foi então transferida para um erlenmeyer e colocada no shaker a 30 °C, agitação de 150 rpm durante 2 horas. Posteriormente, as leveduras hidratadas foram plaqueadas com auxílio da alça de platina em placas de Petri que continham meio de cultura sólido YPG 10%, para crescimento celular, em ambiente estéril.

4.2.4.2. Preparo do Inóculo das Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* no Meio de Cultura Rico

As diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram plaqueadas em placas de Petri que continham o meio YPG 10%, e então foram mantidas em estufa a 30 °C por aproximadamente 24 horas, até crescimento de colônias isoladas (Figura 9). O plaqueamento foi feito conforme técnica de esgotamento, no qual dividiu-se a placa de Petri em três setores. Primeiramente a alça de platina foi flambada na chama, esperou-se alguns segundos até que ela resfriasse para coleta dos microrganismos. A alça de platina foi introduzida no frasco eppendorf com as leveduras (no caso das linhagens BG-1, FT-858, JP-1, PE-2, SA-1), e, em seguida, a alça foi conduzida a superfície do primeiro setor da placa com o meio de cultura, depositando os microrganismos sobre essa região em forma de estrias. Flambou-se a alça novamente, para esterilização. Deslizou-se a alça de platina partindo do primeiro setor até plaqueamento do segundo setor da placa de Petri. Por fim, esterilizou-se a alça de platina mais uma vez, para distribuição dos microrganismos no terceiro setor da placa.



Figura 9. Placa de Petri após crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.

O inóculo das leveduras *S. cerevisiae* foi feito em erlenmeyers com o meio de cultura líquido YPG 10%. O procedimento consistiu em flambar a alça de platina, resfria-la, colher microrganismos de uma colônia pura da placa de Petri, e adicioná-los ao meio de cultura líquido, sendo realizado em ambiente estéril (capela de fluxo laminar). O inóculo era realizado sempre com aproximadamente 16h de antecedência da fermentação. Isso porque os meios de cultura líquidos eram levados ao shaker, à 32 °C e 150 rpm para crescimento celular durante esse período. No dia em que se realizaria a fermentação, determinou-se a viabilidade celular de cada meio com as respectivas linhagens da levedura. Em seguida, o meio com as leveduras contidos nos erlenmeyers era transferido para frascos de centrifuga, para centrifugação a 4700 rpm, por 5 minutos no equipamento Centrífuga de Bancada, da marca Thermo Scientific, modelo Megafuge 40R. O precipitado foi resuspenso, e concentrado em um único frasco esterilizado com o respectivo nome da linhagem, sendo que o sobrenadante foi descartado.

4.2.5. DETERMINAÇÃO PESO SECO DAS LEVEDURAS

Determinou-se a concentração celular das leveduras por meio da técnica de obtenção do peso seco e construção da curva padrão. Pesou-se e identificou-se algumas placas de Petri com o nome das respectivas linhagens da levedura *S. cerevisiae*. As mesmas, foram condicionadas em Estufa com Circulação e Renovação de Ar SL-102, da marca Solab, a 120 °C por 4 horas para remoção de umidade. As placas foram então esfriadas em dessecador por 1 hora. Adicionou-se 1 mL do meio com as leveduras, sendo que para cada linhagem foram utilizadas três placas. Em seguida, pesou-se as placas com o meio. As placas foram colocadas na estufa a 70 °C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram resfriadas em dessecador por 1 hora e pesadas. Após registro das respectivas massas, as placas voltaram para a estufa onde permaneceram por mais 2 horas. Após esse período, foram resfriadas em dessecador por 1 hora e novamente pesadas. O procedimento finalizou quando não houve mais variação no valor da massa, sendo possível determinar o peso seco (g) das leveduras e suas respectivas concentrações celular (g/L).

Para determinar a concentração celular de uma levedura em um meio/substrato fermentativo é necessária a construção de uma curva padrão, realizada por meio de espectrofotometria, com os valores de absorbância e concentração celular. Após o inóculo da levedura no meio de cultura rico, uma alíquota foi retirada e desta pequena amostra preparou-se cinco diferentes diluições: 1:8; 1:16; 1:20; 1:32; 1:64. Realizou-se as leituras de absorbância no Espectrofotômetro Spectramax Molecular Devices, da marca Tecnal, com comprimento de onda de 600 nm em cubeta de quartzo. Com os valores das diluições multiplicados pela concentração celular obtida pelo peso seco, e o valor das absorbâncias, foi possível plotar a curva padrão para a determinação da concentração celular de cada linhagem, apresentadas na Figura 10. Dessa forma, obteve-se uma equação da reta para cada levedura.

Estas curvas eram construídas de tempos em tempos para avaliar se a relação massa de levedura e densidade ótica se mantinha constantes.

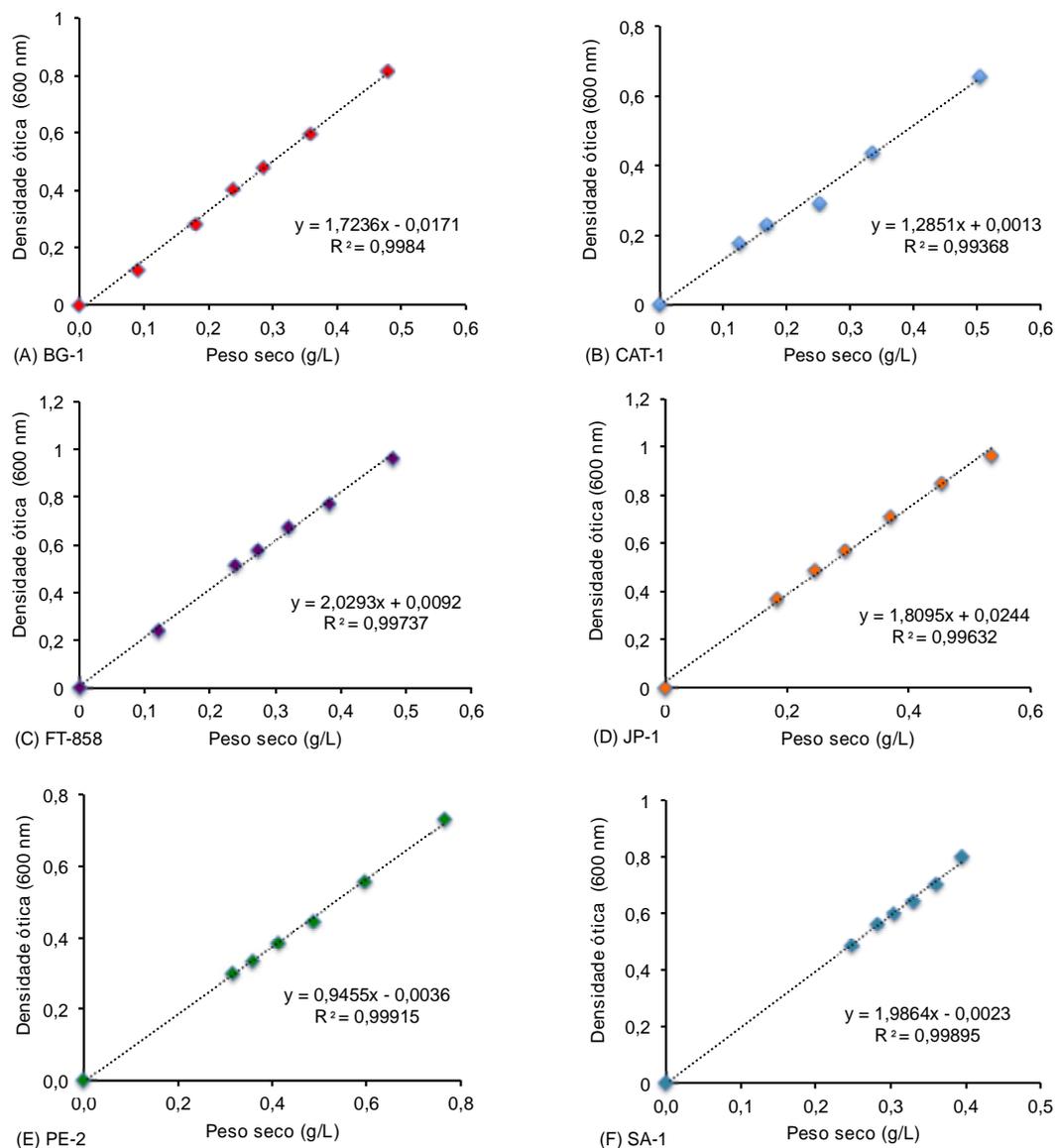


Figura 10. Gráficos de correlação de Peso seco de cada linhagem com a densidade ótica, onde: (A) levedura BG-1; (B) levedura CAT-1; (C) levedura FT-858; (D) levedura JP-1; (E) levedura PE-2; (F) levedura SA-1.

4.2.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Determinou-se a viabilidade celular com base no método de Quantificação de Leveduras/Esporos empregando Câmara de Neubauer, no qual contam-se as células de leveduras vivas e mortas, por unidade de volume de uma suspensão. A contagem celular era feita em triplicata, e ao final, realizava-se a média para obtenção do percentual de células vivas.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de microscopia com marcações em quadrantes, com medidas conhecidas. A câmara possui dois retículos na porção central, longitudinalmente separador por um sulco profundo sobre a lâmina e transversalmente por quatro sulcos que limitam três plataformas. A plataforma central limitada superiormente por uma lamínula espacial adaptada, colocada firmemente sobre as plataformas laterais. A câmara de Neubauer possui 0,1 mm de profundidade, 25 quadrados, sendo 16 retículos em cada quadrado, 400 retículos totais no quadrante central. Estima-se a concentração de células presentes na amostra analisada com base na área da superfície determinada. Nesse método, uma solução de eritrosina é utilizada, colorindo de rosa as células mortas. As células vivas permanecem incolor, e com base na relação de células incolores (vivas) e células coradas (mortas), estima-se a porcentagem de leveduras vivas em relação à população total.

4.2.6.1 Preparo de Soluções de Trabalho

A determinação da viabilidade celular requer o uso de algumas soluções, como: solução tampão fosfato; solução estoque de eritrosina; solução de trabalho de eritrosina.

Para o preparo do tampão fosfato, pesou-se 17,90 g de fosfato de sódio bibásico em um béquer de vidro, adicionou-se pequena quantidade de água destilada estéril e com auxílio de um bastão de vidro, misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL, e avolumou-se com água destilada estéril. Em outro béquer, pesou-se 6,89 g de fosfato de sódio monobásico, adicionou-se pequena quantidade de água destilada estéril, e misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a solução para um segundo balão volumétrico de 250 mL e avolumou-se com água destilada estéril. As soluções dos dois balões volumétricos foram então misturadas e transferidas para um frasco reagente de 500 mL, o qual foi armazenado sob refrigeração ao abrigo de luz.

A solução estoque de eritrosina foi preparada pesando-se 0,1g de eritrosina em um béquer de vidro e misturando-se com pequena quantidade de água destilada estéril. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e avolumada

com água destilada estéril. Após preparo, a solução estoque foi armazenada em abrigo de luz à 4 °C.

Para a solução de trabalho de eritrosina, adicionou-se 0,1 mL da solução estoque de eritrosina para cada 5,0 mL de tampão fosfato. A solução restante era armazenada ao abrigo de luz e sob refrigeração.

4.2.6.2 Contagem de Células Viáveis de Leveduras

Antes de iniciar a contagem de células e determinar a porcentagem de células vivas em relação ao número total (células vivas e células mortas) preparou-se a câmara de Neubauer. Limpou-se as plataformas da câmara de contagem com água destilada e fixou-se a lamínula às plataformas da câmara. Após colocar a lamínula, comprimiu-se levemente a mesma sobre as plataformas para obter boa fixação.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da suspensão de células e 1 mL da solução trabalho de eritrosina. Utilizou-se o agitador de tubos Vortex para homogeneização. Retirou-se 10 µL da solução contida no tubo de ensaio e colocou-se entre o retículo da câmara e a lamínula. Ressalta-se que a amostra foi preparada como uma suspensão de células com um volume conhecido de água destilada estéril. Quando necessário, realizavam-se diluições a partir dessa solução.

Com a câmara de Neubauer já preparada, ajustou-se o Microscópio Trinocular da marca BEL Photonics, para início da contagem celular. Posicionou-se a câmara no microscópio, e obteve-se o foco com a objetiva de 40x. Contaram-se as células incolores (vivas) e as células coradas de rosa (mortas) bem como os brotos contidos nos 25 quadrículos (16 retículos cada um), totalizando 400 retículos. Para evitar contar células a mais que estivessem sobre as linhas laterais, adotou-se o critério: para cada quadrado médio, contaram-se apenas as células que estavam em cima da linha superior e da linha à esquerda.

Ao término da contagem, era necessário realizar a assepsia da câmara e da lamínula, com etanol 70 %, seguida de lavagem com água corrente e sabão. Determinou-se a viabilidade celular conforme equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Total de células viáveis (vivas)}}{\text{Total de células (viáveis + não viáveis)}} \times 100$$

4.2.7. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E DE ARROZ GIGANTE

As fermentações foram conduzidas em dois sistemas distintos. Para avaliar o comportamento das diferentes linhagens comerciais de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, as reações de fermentações foram conduzidas em erlenmeyer, a 32 °C sob agitação a 150 rpm, em um Shaker Orbital de Solo com Incubação e Refrigeração da Thermo Scientific. Após quantificação dos produtos de fermentação por meio de análise de CLAE, linhagem que apresentou melhor desempenho foi escolhida para ser utilizada nas fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz BRS AG em um sistema de Fermentação modelo Dasgip Bioblock, marca Eppendorf.

4.2.7.1. Fermentação em Erlenmeyer e Shaker Orbital

Utilizou-se as linhagens comerciais BG-1, CAT-1, FT-858, JP-1, PE-2, SA-1, para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante, realizadas em triplicatas. Dessa forma, os erlenmeyers utilizados nas fermentações foram nomeados conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Fermentações realizadas em erlenmeyer com as diferentes leveduras e hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.

BG-1		CAT-1		FT-858	
BG.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	CAT.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	FT.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)			
BG.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	CAT.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	FT.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)			
BG.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	CAT.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	FT.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)			
BG.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	CAT.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	FT.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)			
BG.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	CAT.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	FT.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)			
BG.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	CAT.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	FT.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)			
JP-1		PE-2		SA-1	
JP.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	PE.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	SA.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)			
JP.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	PE.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	SA.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)			
JP.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	PE.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	SA.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)			
JP.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	PE.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	SA.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)			
JP.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	PE.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	SA.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)			
JP.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	PE.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	SA.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)			

Antes de iniciar as reações de fermentação, amostras dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante foram retiradas para quantificação de glicose por

meio de CLAE. Quando se obtinha uma concentração superior a 120 g/L de glicose, os hidrolisados eram diluídos a essa concentração, com a solução tampão citrato de sódio 0,1 M. Isso porque o inóculo foi feito utilizando-se 20% de leveduras em relação à quantidade de açúcares. Além disso, o volume de hidrolisado em cada erlenmeyer correspondia a 140 mL. A determinação da viabilidade celular também era realizada antes de iniciar as reações de fermentação, para que pudesse determinar de fato a quantidade de levedura necessária no inóculo.

Ajustou-se os parâmetros do shaker para a temperatura de 32 °C, agitação de 150 rpm. As fermentações transcorreram por 72 horas, sendo que alíquotas foram retiradas com tempos de fermentação de: 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 28 h, 32 h, 48 h, 52 h, 56 h e 72 h. As amostras retiradas foram centrifugadas e congeladas para posterior quantificação dos produtos de fermentação por CLAE.



Figura 11. Sistema utilizado para as reações de fermentação com as diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2.7.2. Reações de Fermentação Conduzidas no Sistema de Fermentação

As reações de fermentação foram realizadas com os hidrolisados centrifugados e não centrifugados do arroz comercial e arroz gigante, conduzidas no Sistema de Fermentação, modelo Dasgip Bioblock, sob controle de temperatura, agitação e pH. Antes de dar início as fermentações, determinou-se a viabilidade celular do meio de cultura com a levedura CAT-1, bem como amostras dos hidrolisados de ambos os arrozes foram retiradas para quantificação de glicose por meio de CLAE. Quando obtinha-se uma concentração de glicose superior a 120 g/L, os hidrolisados eram diluídos a essa concentração, com a solução tampão citrato de sódio 0,1 M. O volume de hidrolisado utilizado para cada reação de fermentação era de 300 mL. O inóculo foi feito utilizando-se 15% de leveduras em relação à quantidade de açúcares.

Para que fosse possível obter o volume (mL) de levedura necessária para fermentação, realizou-se leitura da densidade ótica (DO) no Espectrofotômetro Spectramax Molecular Devices, da marca Tecnal, em triplicata. Para isso, homogeneizou-se o meio líquido YPG 10% com a levedura, retirou-se uma alíquota e a mesma foi diluída 32 vezes. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 600 nm para obtenção da densidade ótica. Após as três leituras, o valor da média da absorbância foi substituído na equação referente a curva padrão obtida após determinação do peso seco de cada linhagem da levedura, fornecendo o valor da concentração celular (g/L).

Levando-se em consideração a viabilidade celular e, com o valor da concentração celular (g/L) e da quantidade de levedura necessária em massa (g), obteve-se o volume (mL) do meio de cultura que deveria ser centrifugado para que as leveduras fossem então adicionadas ao frasco reator. Para a centrifugação do meio, utilizou-se a Centrífuga de Bancada Thermo Scientific, modelo Megafuge 40R, a 4700 rpm, por 5 minutos. As leveduras foram re-suspensas e adicionadas ao frasco biorreator. O sobrenadante foi descartado.

Ajustou-se os parâmetros do fermentador para uma temperatura de 32 °C e agitação de 150 rpm. As fermentações tiveram tempo de duração de 24 horas, sendo que alíquotas foram retiradas, para posterior quantificação dos produtos de

fermentação por CLAE, com tempo de fermentação de: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h.

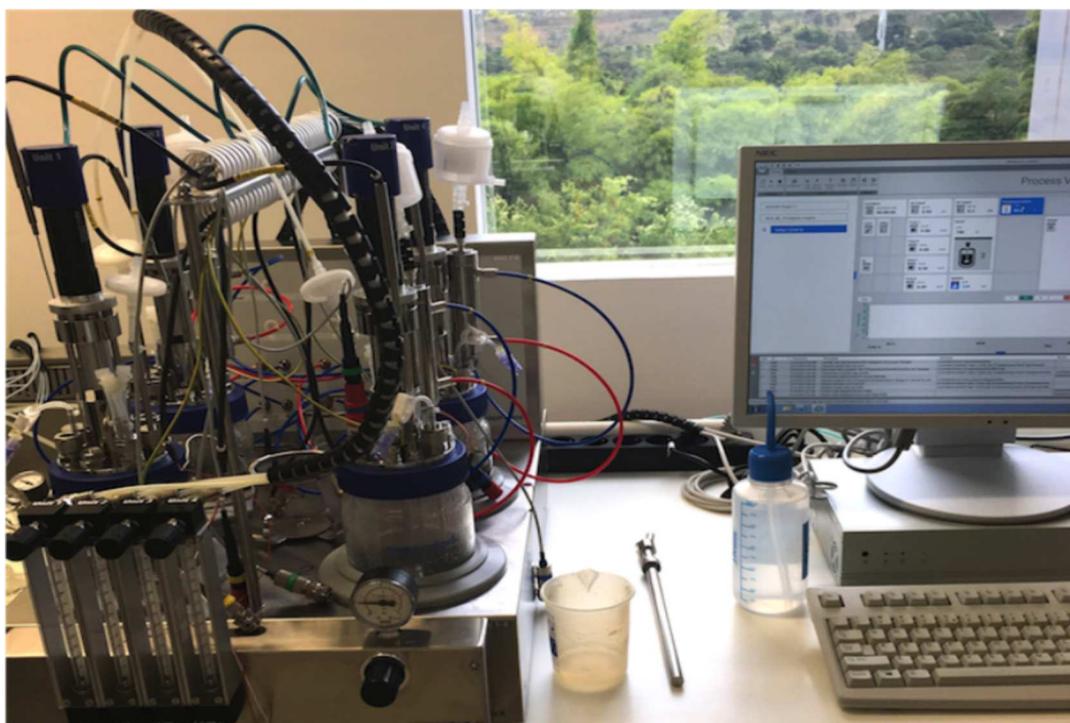


Figura 12. Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.

4.2.8. CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

Após as reações de fermentação dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante, alguns parâmetros de fermentação foram calculados, como: fator de conversão de substrato em produto, rendimento, produtividade e velocidade de consumo de substrato.

4.2.8.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto Etanol

O fator de conversão de substrato em produto foi expresso em $g_{\text{etanol}}/g_{\text{glicose}}$. O cálculo foi realizado conforme equação:

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S}$$

onde, P é a concentração do produto (g/L) e S é a concentração do substrato (g/L).

4.2.8.2. Rendimento da Fermentação

A rendimento das fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante foram obtidos com base no rendimento teórico oriundo da equação de Gay-Lussac, onde $51,1 \text{ g}_{\text{etanol}}/100\text{g}_{\text{glicose}}$.²⁸ Dessa forma utilizou-se a equação:

$$R = (Y_{P/S} \cdot 100) / 0,511$$

4.2.8.3. Produtividade

A produtividade do processo foi determinada pela concentração de etanol obtida em relação ao tempo da fermentação, e expressa em $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L}\cdot\text{h}$.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Concentração de etanol (g/L)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}}$$

4.2.8.4. Velocidade de consumo de substrato

A velocidade de consumo de substrato foi determinada pela quantidade de glicose consumida (g/L) com relação ao tempo de fermentação (h).

$$V = \frac{S}{T}$$

onde, S é a concentração do substrato (g/L) e T é o tempo transcorrido de fermentação.

4.2.9. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação da glicose obtida após reações de hidrólise enzimática, bem como a quantificação dos produtos da fermentação, foram feitas por meio de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizadas no equipamento Infinity 1260 Agilent Technology, com coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (BioRad), temperatura da coluna a 45 °C, de tector índice de refração (RID), temperatura da cela do detector a 40 °C. A fase móvel para essa coluna cromatográfica corresponde uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, com vazão de

0,600 mL/min. O tempo de retenção aproximado para a Glicose é de 9 minutos, para o Glicerol é de 13,4 minutos e para o etanol é de 21,6 minutos.

O método de determinação de açúcares, etanol e subprodutos de fermentação, como o glicerol por CLAE consiste em um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases, a fase estacionária, correspondente a coluna cromatográfica, e a fase móvel. A fase móvel passa, então pela fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. A diferença da interação dos analitos com a fase móvel e a fase estacionária possibilita a separação dos compostos.

O equipamento foi utilizado conforme instruções fornecidas pelo fabricante, sendo necessária a construção de uma curva padrão com os compostos de interesse. Dessa forma, preparou-se uma solução padrão com concentração de 5 g/L, pesou-se 0,1250 g de glicose, glicerol e etanol, sendo que todos os reagentes utilizados eram de alta pureza. Solubilizou-se em água Milli-Q e a solução foi avolumada para 25 mL. A partir dessa solução padrão 5 g/L, realizou-se 6 diluições. Separou-se 5 tubos de ensaio, com 1 mL de água Milli-Q em cada tubo. Ao primeiro tubo, adicionou-se 1 mL da solução padrão 5 g/L. Homogeneizou-se em agitador para tubos de ensaio Vortex. Transferiu-se 1 mL da diluição para o próximo tubo e assim sucessivamente, até completar as diluições em série. Cada uma das soluções foi transferida para vials devidamente identificados. Assim, os 6 pontos da curva padrão possuíam concentrações de: 0,15625 g/L; 0,3125 g/L; 0,625 g/L; 1,25 g/L; 2,5 g/L; 5,0 g/L.

As amostras a serem analisadas também foram diluídas de forma que a concentração estivesse dentro dos valores da curva padrão. Após análise das amostras por CLAE, as concentrações obtidas para cada composto eram multiplicadas pelo fator de diluição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As reações de hidrólise enzimática para otimização do processo foram conduzidas no sistema de fermentação, adotando os valores de temperatura e pH ótimos para cada enzima conforme especificações do fabricante. Analisou-se a ausência e a presença da enzima Termamyl 2X, em diferentes tempos, durante a etapa de liquefação do amido. Além disso, a ação da amiloglucosidase AMG 300 L durante a etapa de sacarificação também foi estudada, em diferentes tempos de reação. Alíquotas foram retiradas e analisadas por CLAE para quantificação da glicose. Dessa forma, foram realizados 3 blocos de hidrólises que possibilitaram a avaliação de 15 combinações do conjunto Termamyl 2X e AMG 300 L descritas conforme Tabela 5.

Tabela 5. Reações enzimática realizadas para otimização do tempo no processo de hidrólise do amido presente no arroz.

Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L	Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L	Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L
1	-	1 h	6	-	2 h	11	-	3 h
2	0,5 h	1 h	7	0,5 h	2 h	12	0,5 h	3 h
3	1 h	1 h	8	1 h	2 h	13	1 h	3 h
4	2 h	1 h	9	2 h	2 h	14	2 h	3 h
5	3 h	1 h	10	3 h	2 h	15	3 h	3 h

As amostras obtidas foram analisadas pelo CLAE, os resultados gerados foram plotados num gráfico de barras referente a concentração (g/L) de glicose gerada para as reações de hidrólise em função dos tempos.

Os resultados apresentados na Figura 13, mostram que independente do tempo de ação da Termamyl 2X, após 3 h de reação da AMG 300 L, maior a concentração final de glicose. Além disso, percebe-se que a reação de 1 h de ação da Termamyl 2X e 3 h de ação da AMG 300 L (Hidrólise 13) apresentou maior concentração final de glicose, sendo essa a melhor condição de reação.

Analisando o comportamento da Termamyl 2X, percebe-se que ao não se utilizar essa enzima na etapa de liquefação do amido (Hidrólises 1, 6 e 11), a enzima AMG 300 L não atua de forma eficiente na sacarificação e obtenção de glicose.

Como as ligações internas da amilose e da amilopectina não foram quebradas à dextrinas, a amiloglucosidase não conseguiu romper as ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas na etapa de sacarificação, levando a uma menor concentração final de glicose. Além disso, com base no gráfico de barras, percebe-se que a menor concentração de glicose foi obtida para a hidrólise 1, que a enzima AMG 300 L atuou por 1h. Nas hidrólises representadas pelas barras 6 e 11, nas quais a AMG 300L possuiu tempo de ação de 2 h e 3 h respectivamente, a concentração de glicose final foi similar, aproximadamente 48 g/L.

- | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| ■ 1 0 h Termamyl 2X 1 h AMG 300 L | ■ 6 0 h Termamyl 2X 2 h AMG 300 L | ■ 11 0 h Termamyl 2X 3 h AMG 300 L |
| ■ 2 0,5 h Termamyl 2X 1 h AMG 300 L | ■ 7 0,5 h Termamyl 2X 2 h AMG 300 L | ■ 12 0,5 h Termamyl 2X 3 h AMG 300 L |
| ■ 3 1 h Termamyl 2X 1 h AMG 300 L | ■ 8 1 h Termamyl 2X 2 h AMG 300 L | ■ 13 1 h Termamyl 2X 3 h AMG 300 L |
| ■ 4 2 h Termamyl 2X 1 h AMG 300 L | ■ 9 2 h Termamyl 2X 2 h AMG 300 L | ■ 14 2 h Termamyl 2X 3 h AMG 300 L |
| ■ 5 3 h Termamyl 2X 1 h AMG 300 L | ■ 10 3 h Termamyl 2X 2 h AMG 300 L | ■ 15 3 h Termamyl 2X 3 h AMG 300 L |

Figura 13. Concentrações de glicose durante as reações de hidrólise enzimática do amido presente no arroz comercial.

Para as reações com 30 min de ação da Termamyl 2X (Hidrólises 2, 7 e 12), a menor concentração de glicose foi obtida para a hidrólise 2, a qual a enzima AMG 300 L atuou por 1h. Nas hidrólises 7 e 12, nas quais a AMG 300L possuiu tempo de ação de 2 h e 3 h respectivamente, a concentração de glicose final foi similar, aproximadamente 103 g/L. Com base nos resultados apresentados, percebe-se que com 30 minutos de ação da Termamyl 2X, já foi possível ocorrer o rompimento de