

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CURSO DE ENGENHARIA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS E AMBIENTE

RIZA CRISTINA MASIERO AHMED

QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA CASCA DE ARROZ APÓS  
DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO SEGUIDO DA HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA

BAGÉ  
2013

RIZA CRISTINA MASIERO AHMED

QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA CASCA DE ARROZ  
APÓS DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO SEGUIDO DA  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso II  
apresentado ao curso de Engenharia de  
Energias Renováveis e Ambiente da  
Universidade Federal do Pampa.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Maria Lucchese  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Rosa Muniz

BAGÉ  
2013

RIZA CRISTINA MASIERO AHMED

QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA CASCA DE ARROZ  
APÓS DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO SEGUIDO DA  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso II  
apresentado ao curso de Engenharia de  
Energias Renováveis e Ambiente da  
Universidade Federal do Pampa.

Área de concentração: Agroenergia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em:

Banca Examinadora:

---

Profª Drª Ana Rosa Costa Muniz / Co-orientadora  
Engenharia Química – UNIPAMPA

---

Profª Drª Ana Paula Manera  
Engenharia de Alimentos – UNIPAMPA

---

Profª Drª Cristine Machado Schwanke  
Engenharia de Energias Renováveis e Ambiente– UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Carlos e aos meus filhos Amanda e Luca, por todos os esforços, pelo incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida acadêmica.

A minha querida mãe, que mesmo distante me confortava com palavras de incentivo nas horas difíceis.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Maria Lucchese pela orientação, disponibilidade durante vários semestres e especialmente pela confiança depositada em minha proposta.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Rosa Muniz pela co-orientação sempre com contribuições valiosas e por toda a atenção dispensada.

Aos técnicos do Laboratório de Química, em especial a Técnica Cintia e ao Técnico Leandro e a Técnica Vanessa do laboratório da Engenharia Química pela gentileza e colaboração disponibilizando os equipamentos, reagentes e os laboratórios.

A colega e companheira de TCC, Kely, que através da parceria e agradável convivência tornou mais prazeroso o desenvolvimento experimental desse trabalho.

Aos responsáveis pelo Laboratório da Engenharia de Alimentos pela colaboração e disponibilização de equipamentos.

E aos colegas e professores que de alguma forma ou de outra contribuíram para que eu pudesse realizar o sonho de finalizar a faculdade e tornar-me Engenheira de Energias Renováveis e Ambiente. MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é hoje uma alternativa na redução do uso de combustíveis fósseis. A utilização da casca de arroz para produzir o etanol pode ser uma opção valiosa, por ser um resíduo agrícola abundante e disponível, oriundo do beneficiamento do arroz. Diversas técnicas vêm sendo estudadas objetivando o aprimoramento e o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de etanol, tendo por base o material lignocelulósico. O presente trabalho teve como objetivo quantificar os açúcares redutores de amostra de casca de arroz após o processo de pré-tratamento ácido e básico e pré-tratamento hidrotérmico, seguidos da hidrólise enzimática. Amostras de casca de arroz foram tratadas com ácido sulfúrico diluído numa concentração de 5% (v/v), hidróxido de sódio diluído a 0,25M e água quente. Os pré-tratamentos foram realizados em autoclave a 1,1atm, 121°C por 30 minutos. Posteriormente aos pré-tratamentos realizou-se a hidrólise enzimática que utilizou a enzima celulase como catalisadora da reação. O tempo total de reação da hidrólise foi de 72 horas, à temperatura de 50°C. Os resultados mostraram que o pré-tratamento básico seguido da hidrólise enzimática, foi o processo que liberou o maior número de açúcares redutores, resultando em uma concentração de 1,99 g/L de glicose em solução para o tempo de ativação enzimática de 48 horas. O pré-tratamento ácido apresentou a melhor concentração de glicose (1,27 g/L), após 24 horas de ação enzimática e o pré-tratamento hidrotérmico apresentou a maior concentração de glicose (1,16 g/L) após 12 horas de reação enzimática.

Palavras-chave: casca de arroz; pré-tratamento; hidrólise enzimática.

## **ABSTRACT**

The production of ethanol from lignocellulosic materials is now an alternative in reducing the use of fossil fuels. The use of rice husk to produce ethanol can be a valuable option, being an agricultural residue abundantly available and, arising from the processing of rice. Several techniques have been studied aiming to the improvement and development of new technologies for ethanol production, based on the lignocellulosic material. This study aimed to quantify the sugars sample after the pre-treatment with acid and basic and hydrothermal pretreatment, followed by enzymatic hydrolysis. Samples of rice husk were treated with dilute sulfuric acid at a concentration of 5% (v/v), sodium hydroxide diluted to 0.25 M and hot water. Pretreatments were carried out in an autoclave at 1.1 atm, 121°C for 30 minutes. Subsequently the pre-treatment was performed enzymatic hydrolysis that used the cellulase enzyme as a catalyst of the reaction. The total reaction time of hydrolysis was 72 hours at 50°C. The results showed that pre-treatment followed by base hydrolysis enzymatic process that was released the largest number of glucose, resulting in a concentration of 1.99 g/L of glucose solution for the enzymatic activation time of 48 hours. Pretreatment acid showed the best glucose concentration 1.27 g/L after 24 hours of enzymatic action and hydrothermal pretreatment generated the highest concentration of glucose, 1.16 g/L after 12 h of enzymatic reaction.

**Keywords:** rice husk; pretreatment, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura da celulose formada por unidades de glicose.....	14
Figura 2.2: Arranjo típico da parede celular vegetal.....	14
Figura 2.3: Processo generalizado para produção de etanol celulósico.....	15
Figura 2.4: Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material ligno celulósico.....	17
Figura 2.5: Reação do DNS com a D-glicose.....	21
Figura 3.1: Agitador eletromagnético com peneiras redondas Bertel.....	23
Figura 3.2: Amostras de casca de arroz em solução sendo autoclavadas.....	24
Figura 3.3: Lavagem das amostras.....	25
Figura 3.4: Banho termostático agitado.....	26
Figura 3.5: Amostras no banho termostático agitado.....	26
Figura 3.6: Curva padrão de glicose.....	28
Figura 3.7: Tubos de ensaio com as alíquotas requeridas conforme a tabela 1.....	28
Figura 3.8: (a) Aparelho vórtex (b) Banho – maria.....	29
Figura 3.9: Espectrofotômetro.....	29
Figura 4.1: Gráfico de barras para a concentração de glicose dos hidrolisados.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Alíquotas de reagentes requeridos para a análise de DNS.....	27
Tabela 4.1: Valores de absorvância das amostras submetidas aos diferentes pré-tratamentos e tempos de hidrólise.....	30

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Proálcool.....	Programa Nacional do Álcool
BNDES.....	Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social
CGEE.....	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
IBGE.....	Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
IRGA.....	Instituto Rio Grandense do Arroz
DNS.....	Ácido 3,5-Dinitrossalicílico
AR.....	Açúcares Redutores

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$ .....beta

$\lambda$ .....comprimento de onda

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
2.1	Caracterização do problema .....	13
2.2	A biomassa lignocelulósica .....	13
2.3	O reaproveitamento da biomassa .....	15
2.4	Pré-tratamento da biomassa.....	16
2.4.1	Pré-tratamento mecânico.....	17
2.4.2	Pré-tratamento químico.....	18
2.4.2.1	Tratamento com ácido.....	18
2.4.2.2	Tratamento com base ou tratamento alcalino.....	18
2.4.3	Tratamento hidrotérmico.....	18
2.5	Hidrólise .....	18
2.5.1	Hidrólise enzimática.....	19
2.5.1.1	Enzima.....	20
2.5.1.1.1	Enzima Celulase.....	21
2.6	Análise DNS.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Material lignocelulósico: Casca de arroz .....	23
3.2	Pré-tratamento mecânico.....	23
3.3	Pré-tratamento químico.....	24
3.3.1	Pré-tratamento químico ácido e básico.....	24
3.3.2	Pré-tratamento hidrotérmico.....	25
3.4	Hidrólise enzimática.....	25
3.5	Análise do material lignocelulósico.....	27
3.5.1	Quantificação de açúcares.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5	CONCLUSÃO .....	34
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1974, o Brasil entrou na tecnologia dos biocombustíveis com o início do Programa Nacional do Álcool – Proálcool, o qual tinha como objetivo estimular a produção de etanol. Em poucos anos, carros movidos exclusivamente a álcool foram lançados no mercado, devido ao desenvolvimento tecnológico automotivo, reduzindo assim a importação de petróleo. Dez anos depois do início do programa, 90% dos carros novos eram movidos a álcool. Na década de 90, uma brusca redução no preço do petróleo somado às modificações na política nacional do álcool, fizeram com que a aquisição de carros a álcool diminuísse muito, atingindo 0,1% (HOUGHTON et al., 2001 apud LIMA E RODRIGUES, 2007).

Atualmente, o combustível utilizado para mover veículos é o álcool hidratado, composto por 96% de álcool puro e 4% de água e o álcool anidro, composto por 99,5% de álcool puro e 0,5% de água o qual é adicionado à gasolina numa proporção de 25%. Nos dias de hoje, alguns fatores favorecem o álcool hidratado na competição com a gasolina, são eles: a redução dos custos no setor, aumento do preço do barril de petróleo e diferenças de tributação entre a gasolina e o álcool. Em 2003, com o surgimento dos carros bicombustíveis, que podem ser movidos a álcool e/ou gasolina independentemente da proporção, despertou o interesse dos consumidores pelo álcool, já que a decisão na hora de optar pelo combustível pode ser baseada em seus preços. O aumento do consumo e da produção de álcool hidratado, devido, sobretudo, às preocupações climáticas e econômicas é muito promissor, já que o combustível é substituto direto da gasolina, derivada do petróleo (LIMA E RODRIGUES, 2007).

Nos dias de hoje, no Brasil a produção de álcool ou, como também é chamado, biocombustível etanol se dá a partir da cana de açúcar. O biocombustível etanol é produzido através da fermentação da sacarose sintetizada pela cana de açúcar através da absorção de energia solar. Esse é o denominado etanol de primeira geração, cujas etapas do processo de produção consistem na preparação, extração do caldo da cana-de-açúcar, fermentação, destilação e desidratação. Como resíduo dessas etapas, surge uma grande quantidade de material, denominada biomassa de cana-de-açúcar. A partir da biomassa se produz o bioetanol ou etanol de 2º geração. A produção eficiente e sustentável de bioetanol destaca-se entre todas as outras fontes energéticas renováveis disponíveis, sendo capaz de atender às urgentes demandas para a redução das emissões de gases de efeito estufa.

Pelas características que possui, a massificação da utilização de etanol é capaz de melhorar a qualidade do ar nas metrópoles, além de ter preço competitivo em relação às fontes convencionais. Atualmente é considerada a melhor alternativa disponível considerando as variáveis trabalho, terra, água e Sol para a produção de biocombustíveis. A cana-de-açúcar é a opção de biomassa energética de maior produtividade de bioetanol por área plantada e de melhor balanço energético. Na condição da transformação do bagaço da cana em bioetanol, o aproveitamento da cana para biocombustível se torna integral, aumentando assim a oferta desse combustível sem exigir um aumento proporcional das áreas de plantio. O álcool celulósico, ou bioetanol, é considerado uma alternativa valiosa para aumentar a produção do biocombustível. Assim, investir na produção de bioetanol representa uma oportunidade estratégica em um cenário de crescente demanda global por energia limpa. (BNDES, CGEE, 2008).

Nas esferas ambientais e econômicas, a tecnologia de produção de bioetanol por meio de materiais celulósicos, é uma alternativa para a produção de um biocombustível eficiente. Essa técnica para obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolve a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção de bioetanol (CGEE, 2009). Objetivando a produção de bioetanol, os resíduos de natureza lignocelulósica, podem ser aproveitados para gerar energia (RAMBO, 2009). Segundo Schuchardt et al (2001), 1% da biomassa produzida anualmente no Brasil seria necessária para substituir o petróleo, já que a produção gira em torno de  $21 \times 10^9$  toneladas de biomassa por ano, sendo que isto não afetaria a produção de alimentos.

Atualmente, o Brasil é um dos líderes mundiais na produção de alimentos. Com uma safra da ordem de 160 milhões de toneladas em 2012 (IBGE, 2013), o país ocupa posição de destaque na produção de leguminosas, oleaginosas e cereais, dentre os quais o arroz, cultura que associada ao milho e a soja correspondem a cerca de 90% da safra agrícola brasileira. Neste contexto, o Rio Grande do Sul emerge como o terceiro maior produtor nacional de grãos, responsável por 15,6% do total, ocupando ainda a liderança na cultura orizícola. O Estado responde por 63% da colheita realizada no Brasil, tendo colhido 7.042,5 mil toneladas do cereal no ano de 2012 (IRGA, 2013).

O arroz consumido diariamente na mesa de milhões de brasileiros é apenas parte do produto, no processo de beneficiamento do cereal, embora o grão seja a estrela, outros subprodutos também possuem relevância do ponto de vista comercial, como o gérmen e o

farelo, ou residual aonde figura a casca do arroz. Historicamente, este resíduo agregava pouco ou nenhum valor à produção sendo o despejo na natureza o meio mais utilizado para o seu descarte. Tal atividade, além de poluente, pois submete o ambiente ao depósito de material orgânico de lenta decomposição, é contraproducente, tendo em vista as possibilidades que a casca apresenta, tanto como matéria-prima para composição de produtos industrializados, notadamente o alto teor de silício resultante das cinzas provenientes da queima da casca, além da possibilidade do seu aproveitamento para a produção de energia. Em relação a esta última, a comunidade científica vem olhando além da simples queima em caldeiras, já que a casca corresponde aproximadamente a 22% da massa do cereal, a rizicultura gera 1.550 mil toneladas deste subproduto, possuindo assim enorme potencial para a produção de bioetanol através do processo de fermentação de açúcares.

Para o presente estudo utilizou-se a casca de arroz, fonte de matéria prima lignocelulósica, por ser resíduo agrícola oriundo do beneficiamento do arroz que é abundante na região sul do Rio Grande do Sul. O trabalho foi realizado com o objetivo de investigar processos de pré-tratamento que facilitem a hidrólise enzimática do material e sua subsequente susceptibilidade à formação de açúcares fermentescíveis, para posterior produção de álcool (bioetanol).

Este trabalho está organizado da seguinte forma, no capítulo dois apresenta-se a revisão bibliográfica que discute a biomassa lignocelulósica, a produção de bioetanol e o método para a quantificação de açúcar, no capítulo três a metodologia a ser aplicada nos procedimentos práticos e o tipo de análise para a posterior quantificação de açúcares redutores são apresentados, no capítulo quatro se encontra os resultados da aplicação da metodologia, da técnica analítica, e a discussão e a conclusão do trabalho encontra-se no capítulo 5.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Caracterização do problema

Neste trabalho optou-se por utilizar a casca de arroz como fonte de matéria prima para a produção de bioetanol, pois este é um subproduto abundante da região onde este trabalho está sendo feito, a metade Sul do estado do Rio Grande do Sul, cerca de 63% da produção nacional desta cultura é oriunda desta região.

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe (DINIZ, 2005), durante o processo de beneficiamento da leguminosa a casca é descartada podendo ser usada na produção de energia, como queima direta em caldeiras, na construção civil, na agricultura como fertilizante e como corretivo de solos (SOUZA et al, 2000). O problema é que em época de safra há uma grande quantidade de casca e o descarte deste subproduto acaba sendo um problema não somente econômico como também ambiental. O aproveitamento adequado do resíduo torna-se fonte de vantagens para os beneficiários, que poderão descartar a matéria prima, e para a comunidade, através da criação de empregos (RAMBO, 2009). Neste sentido este trabalho vem agregar valor a um subproduto agroindustrial com o objetivo de produzir um biocombustível renovável.

Basicamente os principais componentes da casca de arroz são celulose, hemicelulose, lignina e minerais, cada um destes elementos deve variar de acordo com o tipo de solo e condições de cultura (DINIZ, 2005).

### 2.2 A biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, responsável pela manutenção das células unidas. A fração celulósica (40% a 60% da matéria seca) foi identificada como um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), de constituição rígida e difícil quebra, representada na figura 2.1. A fração hemicelulósica (20%-40%), em geral, é composta por uma cadeia principal de xilose, com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico, entre outras substâncias. Já a estrutura bioquímica da fração de lignina (10% - 25%) não relaciona-se às moléculas simples de açúcar (BNDES, CGEE, 2008).

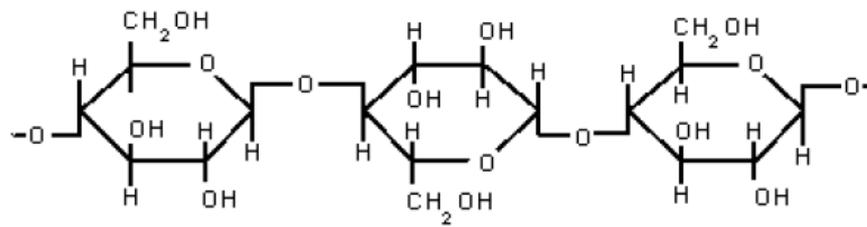


FIGURA 2.1 - Estrutura da celulose formada por unidades de glicose.  
Fonte: Bevilaqua, 2010.

A celulose e a hemicelulose são predominantes na região da parede celular. A lignina se espalha por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A figura 2.2 representa a estrutura da parede celular vegetal. A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A resistência às pragas e doenças é atribuída à presença da lignina, a qual em algumas paredes celulares ainda fornece força adicional ao tecido vegetal (FENGEL & WEGENER, 1989 *apud* FUGITA, 2010).

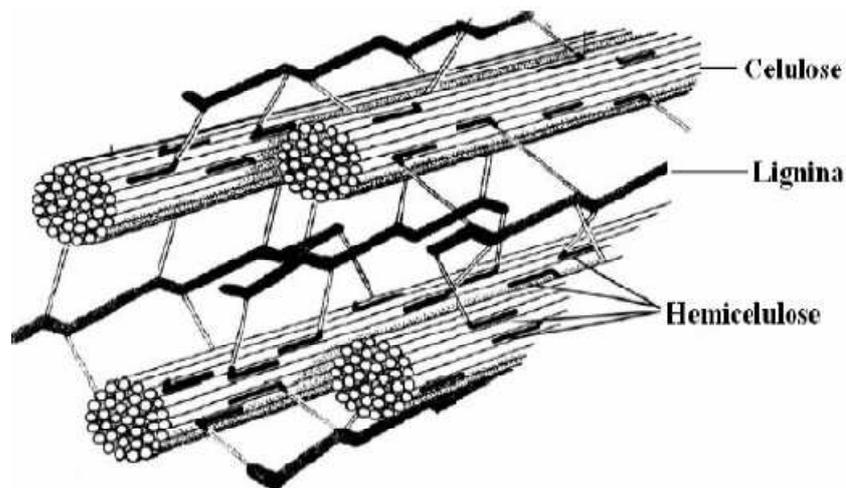


FIGURA 2.2 - Arranjo típico da parede celular vegetal  
Fonte: Murphi e Mccarthy, 2009.

Tanto a celulose como a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (SREENATH & JEFFRIES, 2000). Contudo, a presença da lignina na parede celular dificulta a hidrólise enzimática dos carboidratos (FUGITA, 2010). Pesquisas confirmam a necessidade de submeterem-se as biomassas a um processamento extensivo para

a transformação em açúcares fermentescíveis. Posteriormente, para a produção de combustíveis, deve-se proceder a uma conversão biológica.

### 2.3 O reaproveitamento da biomassa

Para a utilização da biomassa na produção de bioetanol, é necessário submeter o material a várias etapas de processamento: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. Os processos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (FERRAZ et al., 1994; CARRASCO, 1992). Concluído o pré-tratamento, a celulose é então hidrolisada. A hidrólise de materiais lignocelulósicos, pode ser realizada via processos químicos (hidrólise ácida ou básica) ou biológicos (hidrólise enzimática). Este processo resulta na liberação de glicose para posterior fermentação. A fermentação da glicose segue então o procedimento usual já estabelecido, produzindo etanol (PACHECO, 2011; BNDES; CGEE, 2008). A figura 2.3 descreve esquematicamente o processo para a produção de etanol celulósico ou bioetanol.

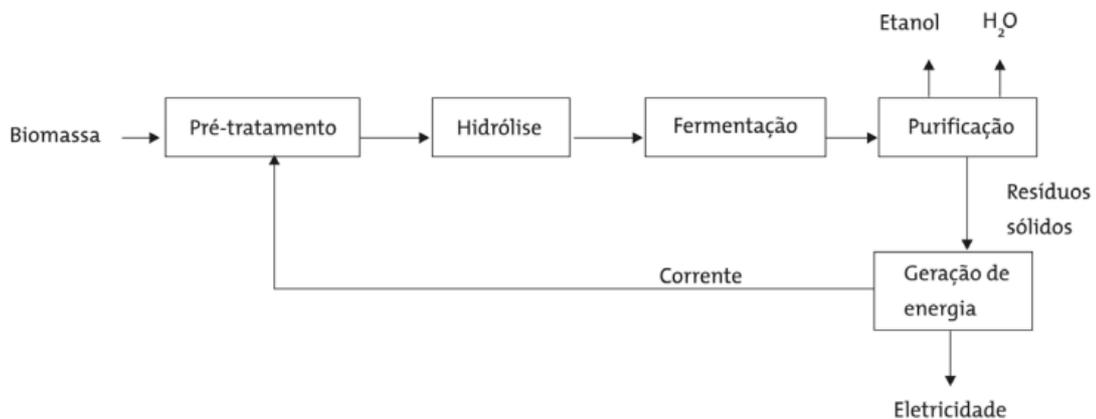


FIGURA 2.3 - Processo generalizado para produção de etanol celulósico.  
Fonte: Hamelinck et al., 2005.

Diversas técnicas vêm sendo estudadas objetivando o aprimoramento e o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de etanol, tendo por base material lignocelulósico. Como exemplo, a que consiste em um pré-tratamento, opcional, que efetua a separação da hemicelulose e não desestrutura a celulose. A fermentação das pentoses geradas a partir da hemicelulose requer micro-organismos específicos, sendo ainda uma barreira a ser superada pelos muitos estudos dedicados ao etanol de segunda geração (PACHECO, 2011).

No processo de hidrólise enzimática, em que a ação de enzimas resulta na produção de glicose, por enquanto permanecem desconhecidos os micro-organismos e as condições para a produção destas enzimas hidrolíticas de forma eficiente e econômica. O alto custo de produção destas enzimas e a constituição complexa da parede celular dos materiais lignocelulósicos, aonde a celulose é protegida de ataques químicos pela hemicelulose e lignina, são alguns dos fatores que dificultam a viabilidade do processo. Assim, por enquanto, este processo permanece na etapa de tentativas (BNDES; CGEE, 2008; PACHECO, 2011).

A lignina separada nos tratamentos tem alto potencial calórico, então seu destino é a queima em caldeiras para produção de energia, que pode ser utilizada nos próprios processos do etanol ou ainda comercializada (PACHECO, 2011).

Embora a taxa de hidrólise e a composição dos açúcares resultantes dependam do método de pré-tratamento/hidrólise e das circunstâncias empregadas, os constituintes principais dos hidrolisados são a glicose e xilose liberados da celulose e hemicelulose, respectivamente. A glicose obtida da hidrólise da celulose pode facilmente ser fermentada por micro-organismos existentes como é feito atualmente. Contudo, a hidrólise da fração hemicelulósica gera, além das hexoses (glicose e um pouco de manose e galactose), as pentoses (xilose e um pouco de arabinose). As tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo da conversão (LEE, 1997 *apud* FUJITA 2010).

De acordo com Rodrigues (2007), a hidrólise ácida é eficiente, possuindo até 90% de recuperação de açúcares fermentescíveis, porém pode gerar alguns produtos inibidores da fermentação (compostos fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), e os açúcares podem ser degradados devido ao tempo de hidrólise.

A hidrólise enzimática, segundo BASTOS (2007), é um processo que apresenta especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas, ou ambientes corrosivos para os equipamentos.

#### 2.4 Pré-tratamento da biomassa

Segundo Silva (2010), o pré-tratamento da biomassa é necessário devido à forte ligação existente entre a celulose, hemicelulose e lignina. O objetivo do processo é remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material, melhorando o processo de hidrólise. Para tanto, o pré-tratamento deve atender às seguintes condições:

- melhorar a formação de açúcares ou a capacidade de futura formação de açúcares pela hidrólise;
- evitar a degradação com perda de carboidratos;
- evitar a formação de co-produtos que sejam inibitórios para hidrólise subsequente;
- ter baixo custo.

O pré-tratamento desorganiza a estrutura da biomassa celulósica, beneficiando o trabalho das enzimas e ácidos que atuam na conversão de celulose (mono/polissacarídeos). A figura 2.4 representa a ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.

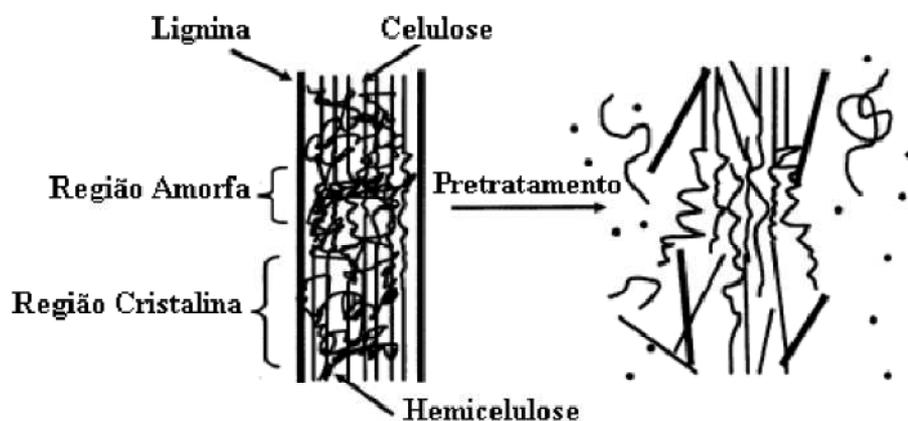


FIGURA 2.4 - Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico  
Fonte: Moiser et al., 2005.

#### 2.4.1 Pré-tratamento mecânico

Em linhas gerais, a etapa inicial do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, visando a limpeza e a desorganização do material, com o objetivo de causar a

destruição da sua estrutura celular, tornando-a mais acessível aos posteriores tratamentos químico, físico ou biológico (ROSA, GARCIA, 2009).

#### 2.4.2 Pré-tratamento químico

##### 2.4.2.1 Tratamento com ácidos

O pré-tratamento químico visa à solubilidade ordenada da hemicelulose e da lignina, para expor a celulose à conversão por componentes ácidos ou alcalinos. No Brasil, os reagentes ácidos mais utilizados são ácidos sulfúricos, clorídricos e nítricos (concentrados ou diluídos). O pré-tratamento com ácido sulfúrico pode alcançar elevadas taxas de reação e, com isso atingir o objetivo de melhorar a hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002), podendo ser diferenciados de acordo com as temperaturas aplicadas no qual se faz necessário a correção do pH antes do processo de hidrólise e fermentação (HAMELINCK et al., 2005).

##### 2.4.2.2 Tratamento com base ou tratamento alcalino

Este tipo de pré-tratamento geralmente utiliza soluções alcalinas diluídas em condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões, em comparação aos sistemas ácidos. O principal efeito do pré-tratamento consiste na remoção da lignina da biomassa, provocada pela quebra das ligações lignina-carboidrato, além de perturbações na estrutura da lignina. O álcali tende a causar um inchamento da biomassa, levando a uma diminuição na cristalinidade do grau de polimerização da celulose (SUN; CHENG, 2002).

##### 2.4.3 Tratamento hidrotérmico

O processo hidrotérmico utiliza água sob alta temperatura e/ou pressão promovendo a clivagem das ligações dos complexos lignina-carboidrato e a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses (MOSIER et al, 2005).

#### 2.5 Hidrólise

A hidrólise é uma reação química que utiliza água para quebrar uma molécula. Esta reação pode ser catalisada por ácido ou enzima, neste trabalho será discutida a hidrólise enzimática uma vez que esta foi a utilizada.

Para a realização do processo de hidrólise são necessárias tecnologias complexas e multifásicas, com a utilização de rotas ácidas ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (BNDES; CGEE, 2008).

A hidrólise permite o aproveitamento dos potenciais individuais dos três polímeros principais da biomassa, ao invés de provocar a conversão simultânea de todos eles. Sob condições apropriadas, a hidrólise de maneira seletiva oferece a possibilidade de conversão da hemicelulose em monossacarídeos (principalmente xilose e manose) e da celulose em D-glicose. A lignina pode ser removida antes da hidrólise ou permanecer como resíduo da reação em função do método utilizado (DUARTE, 1989).

#### 2.5.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves, que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

A hidrólise consiste em uma reação química catalisada por uma enzima na presença de água para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. Um dos produtos da reação catalisada receberá um grupo OH<sup>-</sup> e, o outro produto, um próton de hidrogênio que serão incorporados à suas estruturas químicas (ARAUJO et al., 1980 *apud* GOMEZ, 2010).

Durante a hidrólise são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses e as hexoses. As pentoses são provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, e as hexoses são geradas na degradação de parte das hemiceluloses e celulose. O xarope obtido após a hidrólise da celulose é usado para a fermentação etanólica (RABELO, 2007).

No processo enzimático, a hidrólise é catalisada por enzimas chamadas genericamente de celulasas, estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a

barreira da lignina das células vegetais, constituindo assim o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (RUEGGER et al., 2004).

A taxa e extensão de hidrólise da celulose por enzimas celulásicas são influenciadas pelos substratos e enzimas, incluindo a heterogeneidade da reação, onde tem a ação de uma enzima líquida agindo em um substrato sólido, para isso, uma agitação adequada é exigida assegurando um contato suficiente entre o substrato e enzimas e promovendo transferências de calor e de massa dentro do recipiente da reação. Estudos mostraram que a alta velocidade de agitação (150 rpm) produz um maior rendimento final em açúcares durante a hidrólise enzimática do polímero de celulose (INGESSON et al., 2001). Portanto, o rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, taxa de agitação e temperatura, conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (KNAUF, MONIRUZZAMAN, 2004).

#### 2.5.1.1 Enzima

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza protéica, possuindo assim, estruturas protéicas primárias, secundárias terciárias ou quaternárias, dependendo da atividade catalítica para a qual são destinadas (CAMPESTRINI et al., 2005). Possuem uma estrutura tridimensional com centro ativo, que podem ser afetados por agentes capazes de provocar alterações conformacionais na proteína, tornando a atividade da enzima dependente das características do meio, principalmente da temperatura reacional e do pH.

As enzimas aceleram a velocidade de uma reação, como catalisadores celulares extremamente poderosos, sem participar da reação como reagente ou produto agindo em soluções tampões (soluções aquosas diluídas), sob condições brandas de temperatura e pH, sendo que cada enzima possui uma temperatura e um pH ótimos, na qual a velocidade da reação a qual a enzima está catalisando é máxima. O aumento na velocidade de reação ocorre devido ao fato de a enzima aumentar o número de moléculas capazes de reagir. Após a reação com o substrato, ocorre a separação da enzima e do produto, liberando a molécula catalisadora para novas reações (MARZZOCO et al., 1999).

#### 2.5.1.1.1 Enzima Celulase

A enzima celulase é um complexo que envolve enzimas, cujos modos de ação são distintos e segundo Knauf (2004), o mecanismo mais aceito para a hidrólise enzimática é feito pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente. São as endoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glucanglucanohidrolase), que hidrolisa a molécula de celulose nos centros não cristalinos, as exoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glucan-celobiohidrolase) que formam celobiose partindo do final da molécula de celulose e as  $\beta$ -glucosidases ou celobiasas ( $\beta$ -D-glicoside-glucohidrolase), que hidrolisa a celobiose e forma duas moléculas de glicose.

A atividade das enzimas do complexo celulase é geralmente sinérgica, pois a atividade combinada das enzimas é maior do que a soma da atividade de cada componente ( DAROIT, 2007).

#### 2.6 Quantificação de Açúcares: Análise através do método espectrofotométrico do 3,5 dinitrossalicílico (DNS)

Segundo Butzke et al, (2010) é um método utilizado na quantificação de açúcares redutores. Um açúcar redutor é um açúcar no qual o carbono carbonila (anomérico) não está envolvido em uma ligação glicosídica e, portanto, pode sofrer oxidação. Todos os monossacarídeos são potencialmente redutores, devido a presença da carbonila. Outros carboidratos necessitam serem hidrolisados para se tornarem redutores.

O chamado DNS é o composto empregado no método e que utiliza ácido dinitrossalicílico, sal de Rochelle, (solução de tártaro de sódio de potássio) que serve para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido, fenol, que é utilizado para aumentar a quantidade de cor produzida, bissulfito, que é um estabilizante da cor obtida na presença do fenol e hidróxido de sódio, que é o redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitrossalicílico.

No método do DNS, proposto por Miller (1959), ocorre a seguinte reação de oxidação:

- redução do 3,5-di-nitrosalicitato (de cor amarelo forte) ácido
- oxidação do monossacarídeo
- formação do 3-amino-5nitro-salicilato (de cor laranja-marrom forte), na proporção estequiométrica.

A reação descrita está demonstrada na figura 2.5.

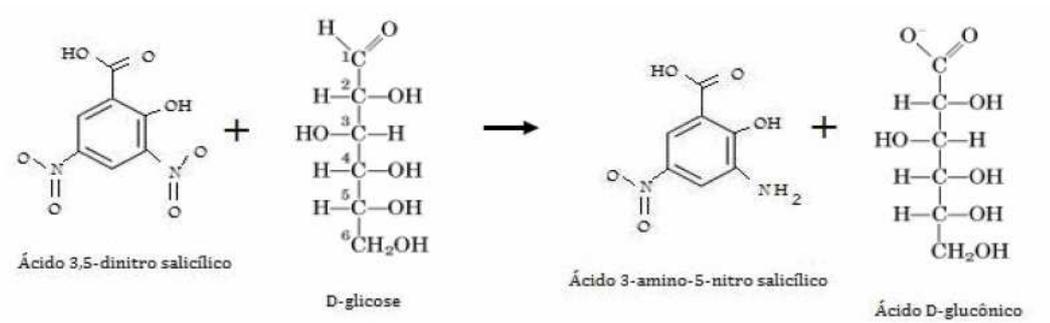


FIGURA 2.5 - Reação do DNS com a D-glicose.  
Fonte: Mendes, 2009.

Através da interação da luz absorvida a 540nm pelo 3-amino-5nitrosalicilato, pode-se determinar a concentração de açúcar redutor presente na solução, pela determinação da lei de Lambert-Beer que explica o efeito da concentração de um constituinte corado, numa solução, sobre a transmissão ou a absorção da luz e estabelece relação entre transmitância, concentração e a espessura da camada absorvedora (SHAN et al, 2002).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os métodos utilizados para a realização do trabalho.

#### 3.1 Material lignocelulósico: Casca de arroz

A casca de arroz foi fornecida por empresa beneficiadora local e submetida a um pré-tratamento mecânico, sendo uma parcela selecionada para ser utilizada no pré-tratamento químico (ácido e básico) e o restante em um tratamento hidrotérmico. A seguir serão descritos mais especificamente como foram realizados estes tratamentos.

#### 3.2 Pré-tratamento mecânico

As amostras de casca de arroz foram moídas em moinho de facas Marconi e posteriormente classificadas em agitador eletromagnético de peneiras redondas Bertel, como mostra a figura 3.1, por 10 minutos. O conjunto de peneiras utilizados da série Tyler continham aberturas de 2 mm, 850  $\mu\text{m}$ , 425  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ .



FIGURA 3.1 - Agitador eletromagnético com peneiras redondas Bertel.

### 3.3 Pré-tratamento químico

A seleção dos parâmetros de temperatura, tempo de reação, a relação sólido/líquido, bem como a concentração do ácido e da base na solução, foram obtidos a partir de dados da literatura (Furlan, 2008 e Rabelo, 2007)

#### 3.3.1 Pré-tratamento químico ácido e básico

Amostras de aproximadamente 2 g de casca de arroz foram tratadas com 20 mL de solução contendo ácido sulfúrico a uma concentração de 5% v/v, e colocadas em autoclave a 1,1atm, tempo de 30 minutos e temperatura de 121°C, conforme figura 3.2. O material autoclavado foi filtrado e lavado até atingir o pH neutro, medido através de peagâmetro. Os processos de filtragem e lavagem do material foram realizados à temperatura de 17°C, com o objetivo de evitar a proliferação de micro-organismos desconhecidos.



FIGURA 3.2 - Amostras de casca de arroz em solução sendo autoclavadas.

O resíduo líquido da filtração foi descartado e a parte sólida (material lignocelulósico) retida no papel filtro foi seca em estufa de circulação forçada (marca Biofoco, modelo BF2 ECF 480) até peso constante e armazenada na geladeira à temperatura de 5°C. Para o pré-

tratamento básico, o mesmo procedimento foi adotado, porém a solução utilizada foi hidróxido de sódio à concentração de 0,25M.

### 3.3.2 Pré-tratamento hidrotérmico

Para o pré-tratamento hidrotérmico foram misturadas 2g de casca de arroz e 20mL de água. A mistura foi levada em autoclave a 1,1atm, tempo de 30 min e temperatura de 121°C. Ao término da reação o material lignocelulósico foi lavado e filtrado (figura 3.3) até atingir pH neutro e posteriormente seco em estufa de circulação forçada da marca Biofoco até peso constante e armazenado na geladeira à temperatura de 5°C.



FIGURA 3.3 - Lavagem das amostras.

### 3.4 Hidrólise enzimática

A sacarificação do substrato pré-tratado foi realizada pela enzima celulase, doada pela empresa distribuidora Celluclast à Universidade Federal do Pampa.

Os parâmetros foram obtidos a partir de dados da literatura. A hidrólise foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 0,5g de material pré-tratado em 45 mL de citrato de sódio 0,05 M, 0,04g de azida sódica e 4,6mL de enzima. O tempo de tratamento total foi de

72 h e a temperatura utilizada durante a hidrólise foi de 50°C que corresponde ao valor encontrado para a temperatura ótima da enzima, onde sua atividade é máxima (RABELO, 2007). Os frascos de Erlenmeyer foram colocados sob agitação em Banho Termostático Agitado (marca Quimis, modelo dist DI-950M), como mostra as figuras 3.4 e 3.5, no nível 2, na qual a escala do equipamento varia de 0 a 10.

Durante o processo de agitação, alíquotas de 2 mL do líquido hidrolisado foram coletas em períodos de tempo de 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, e armazenadas à temperatura de 5°C, para inativação da enzima.

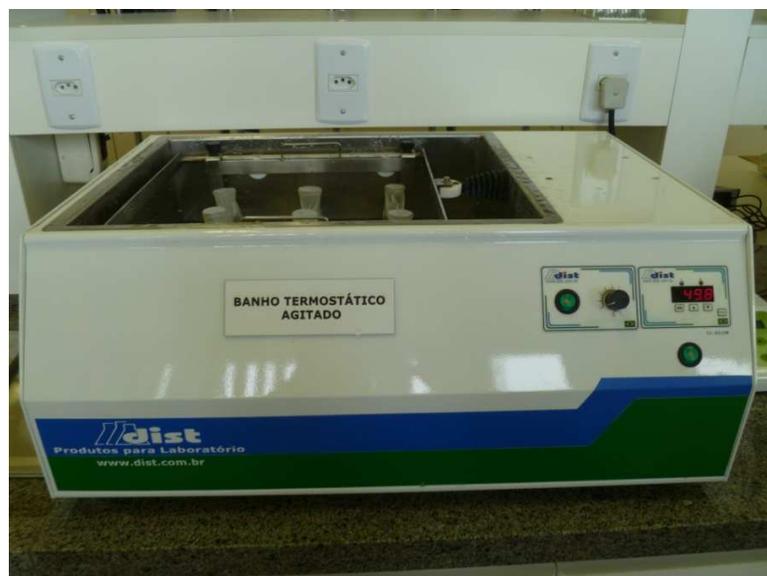


FIGURA 3.4 - Banho termostático agitado.

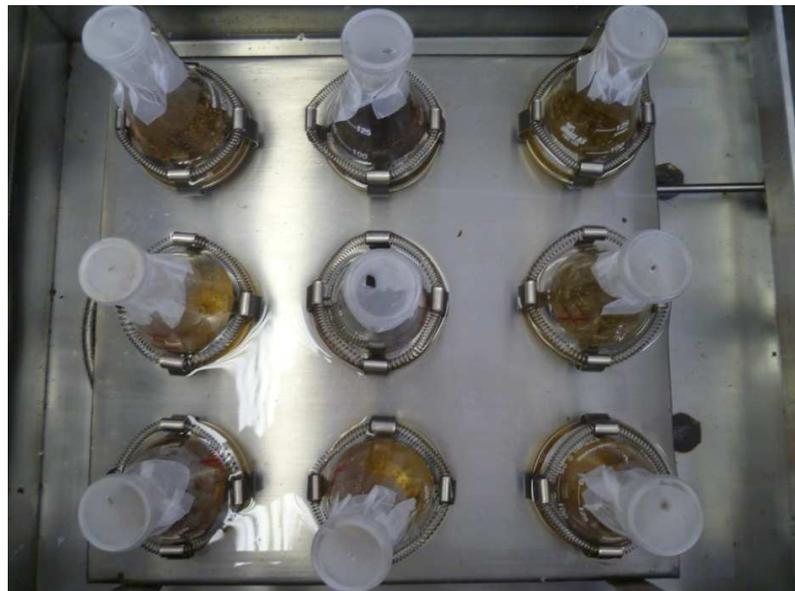


FIGURA 3.5 - Amostras no banho termostático agitado.

### 3.5 Análise do material lignocelulósico

#### 3.5.1 Quantificação de açúcares

O filtrado oriundo da hidrólise enzimática foi analisado quanto aos teores de açúcares redutores. Os açúcares redutores (AR) foram quantificados nos hidrolisados, pelo método espectrofotométrico do 3,5 dinitrossalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). Este método baseia-se na construção de uma curva de calibração de glicose e no comparativo do hidrolisado com os valores obtidos na curva.

A curva padrão da glicose, figura 3.6 para a quantificação pelo método do DNS foi feita adicionando-se em tubos de ensaio alíquotas de DNS, água e solução de glicose (0.01g de glicose em 100mL de água), detalhadas conforme a tabela 3.1.

TABELA 3.1  
Alíquotas de reagentes requeridos para a análise de DNS

<b>Tubos de ensaio</b>	<b>Água destilada (mL)</b>	<b>Reagente DNS (mL)</b>	<b>Solução de glicose (mL)</b>
<b>1</b>	0,0	0,5	1,0
<b>2</b>	0,2	0,5	0,8
<b>3</b>	0,4	0,5	0,6
<b>4</b>	0,6	0,5	0,4
<b>5</b>	0,8	0,5	0,2
<b>6</b>	1,0	0,5	0

A utilização dos princípios teóricos da lei de Lambert-Beer permitiu construir um gráfico comparativo de absorvância versus concentração da substância de onde se obtém a equação da reta,  $y = ax + b$ , na qual x representa a concentração da substância, y representa a absorvância e “a” e “b” são constantes obtidas a partir da linearidade da reta. Por comparação determinam-se concentrações desconhecidas de substâncias em soluções, de um mesmo

material, medindo-se a absorbância obtida com as mesmas variáveis. A figura 3.6 contém a curva padrão elaborada e utilizada neste trabalho.

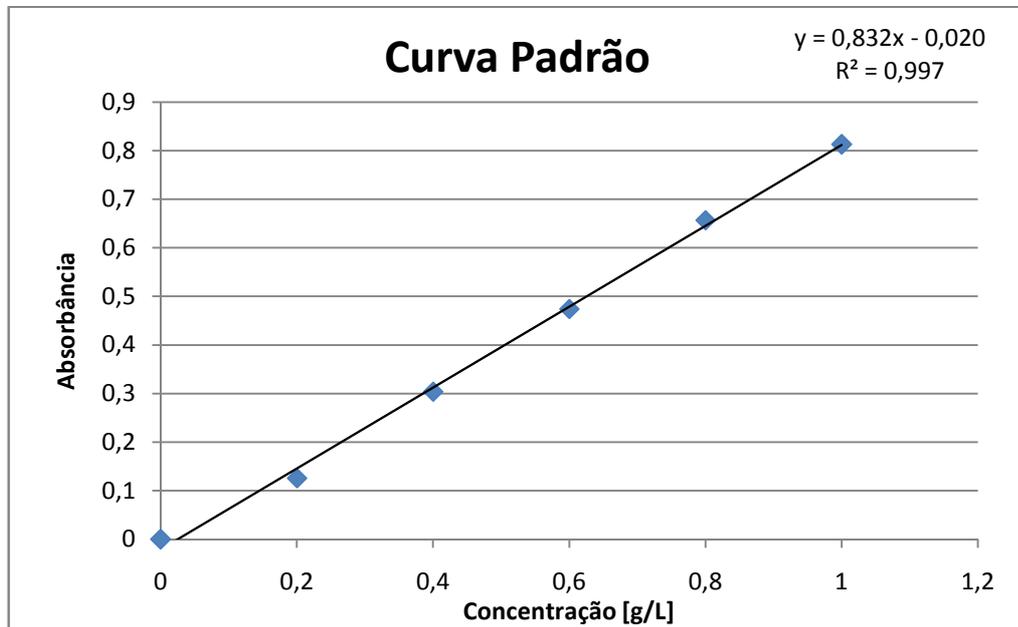


FIGURA 3.6 - Curva padrão de glicose.

Para a determinação da quantidade de açúcar redutor presente nos hidrolisados, foi adicionado 1 mL de amostra diluída por um fator de 10 vezes (a fim de que a absorbância lida das amostras através do equipamento espectrofotométrico se localizassem dentro da curva padrão), em tubos de ensaio e acrescentados a cada um dos tubos 0,5mL do reagente oxidante DNS, conforme figura 3.7.

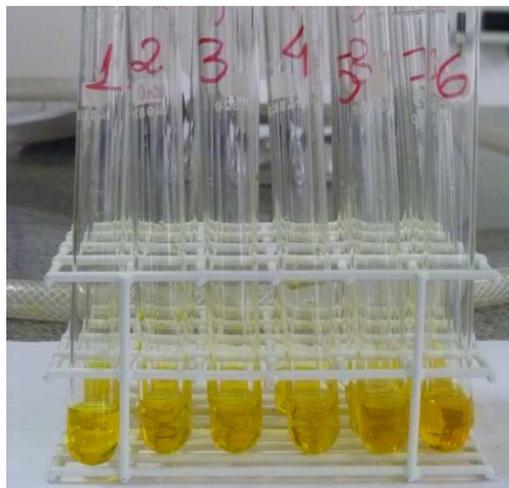


FIGURA 3.7 - Tubos de ensaio com as alíquotas requeridas conforme a tabela 1.

Os tubos foram agitados em vórtex e levados ao banho-maria a 100°C durante 5 minutos (figuras 3.8 a e b).



(a)



(b)

FIGURA 3.8 - (a) Aparelho vórtex (b) Banho – maria.

Os tubos de ensaio foram resfriados e completados com um volume de água de 8.5mL para posterior leitura em espectrofotômetro da marca Equilan, modelo UV 755B no comprimento de onda de  $\lambda = 540$  nm, mostrado na figura 3.9.

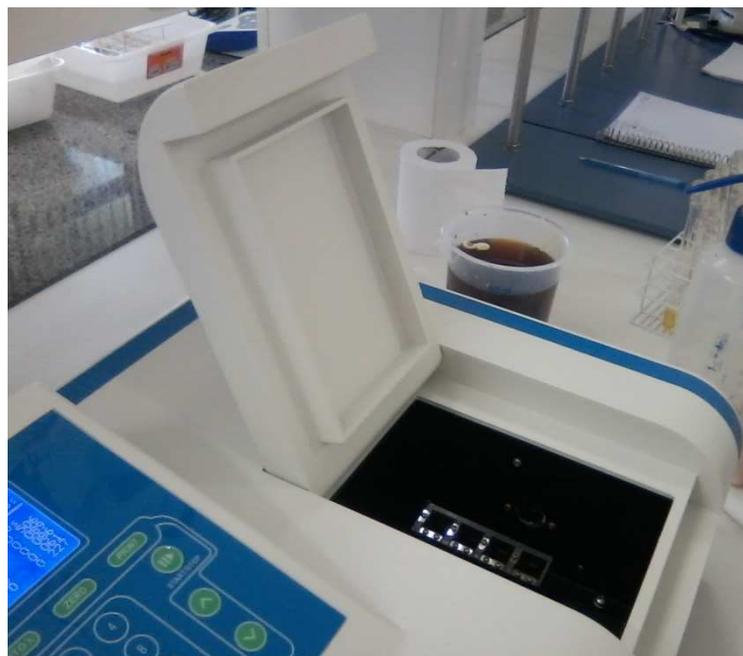


FIGURA 3.9 - Espectrofotômetro.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de pré-tratamento mecânico a média entre os valores granulométricos de casca de arroz foi de 637,5  $\mu\text{m}$ . O material utilizado nos pré-tratamentos que se seguem continha granulometria de 850  $\mu\text{m}$ , proposto por Sun et al. (2000).

A tabela 4.1 mostra as absorvâncias lidas no espectrofotômetro a partir das amostras pré-tratadas e hidrolisadas obtidas através da análise de DNS.

TABELA 4.1:  
Valores de absorvância das amostras submetidas aos diferentes pré-tratamentos e tempos de hidrólise.

<b>Tipo de pré-tratamento</b>	<b>Tempo de coleta(h)</b>	<b>Água destilada (mL)</b>	<b>Reagente DNS (mL)</b>	<b>Solução de glicose (mL)</b>	<b>Amostra (mL)</b>	<b>Absorvância</b>
<b>Ácido</b>	3	0	0,5	0	1,0	0,060
<b>Ácido</b>	6	0	0,5	0	1,0	0,071
<b>Ácido</b>	12	0	0,5	0	1,0	0,076
<b>Ácido</b>	24	0	0,5	0	1,0	0,086
<b>Ácido</b>	36	0	0,5	0	1,0	0,063
<b>Ácido</b>	48	0	0,5	0	1,0	0,081
<b>Ácido</b>	60	0	0,5	0	1,0	0,074
<b>Ácido</b>	72	0	0,5	0	1,0	0,070
<b>Básico</b>	3	0	0,5	0	1,0	0,121
<b>Básico</b>	6	0	0,5	0	1,0	0,130
<b>Básico</b>	12	0	0,5	0	1,0	0,138
<b>Básico</b>	24	0	0,5	0	1,0	0,133
<b>Básico</b>	36	0	0,5	0	1,0	0,127
<b>Básico</b>	48	0	0,5	0	1,0	0,146

<b>Básico</b>	60	0	0,5	0	1,0	0,136
<b>Básico</b>	72	0	0,5	0	1,0	0,123
<b>Hidrotérmico</b>	3	0	0,5	0	1,0	0,057
<b>Hidrotérmico</b>	6	0	0,5	0	1,0	0,072
<b>Hidrotérmico</b>	12	0	0,5	0	1,0	0,077
<b>Hidrotérmico</b>	24	0	0,5	0	1,0	0,061
<b>Hidrotérmico</b>	36	0	0,5	0	1,0	0,060
<b>Hidrotérmico</b>	48	0	0,5	0	1,0	0,067
<b>Hidrotérmico</b>	60	0	0,5	0	1,0	0,059
<b>Hidrotérmico</b>	72	0	0,5	0	1,0	0,066

Através dos valores de absorvância das amostras, calculou-se as concentrações de glicose a partir da equação da reta ( $y = 0,832x - 0,020$ ), obtida da curva de calibração da glicose.

No pré-tratamento hidrotérmico a concentração de glicose no hidrolisado ficou entre os valores de 0,92 g/L e 1,16 g/L. O pré-tratamento com base, apresentou concentrações entre 1,69 g/L e 1,99 g/L. No tratamento ácido, a concentração de glicose resultou em uma concentração média de 1,1 g/L

Conforme mostra a figura 4.1, um gráfico de barras foi montado objetivando comparar a concentração de glicose nas amostras a partir de diferentes pré-tratamentos e tempo de ativação da enzima.

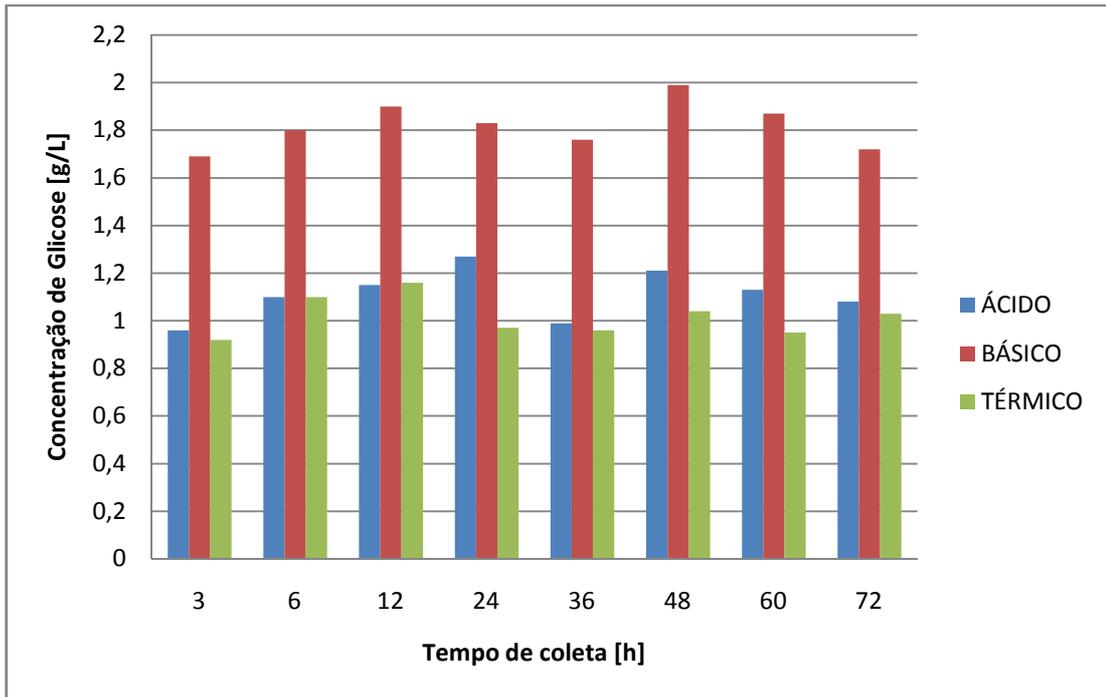


FIGURA 4.1 - Gráfico de barras para a concentração de glicose dos hidrolisados.

Para cada pré-tratamento realizado as maiores concentrações de glicose foram obtidas em diferentes tempos de ativação da enzima. A amostra pré-tratada com ácido alcançou seu melhor desempenho com concentração de glicose de 1,27 g/L, para tanto, nesse mesmo tempo de reação, as amostras que utilizaram o pré-tratamento básico e o pré-tratamento hidrotérmico apresentaram concentrações de glicose de 1,83g/L e 0,87g/L respectivamente.

É importante analisar que as coletas realizadas até o tempo de 24 horas depois do início da reação de hidrólise, para as amostras tratadas com água quente pressurizada e ácido, obtiveram concentrações de glicose, nos valores de 1,27 g/L para a amostra pré-tratada com ácido e 1,16 g/L para a amostra pré-tratada hidrotérmicamente no tempo de coleta de 12 horas.

Pode-se dizer que as concentrações apresentadas na figura 4.1 são muito baixas quando comparadas com a literatura. Existem algumas possibilidades e análises capazes de explicar este fenômeno, tais como: a degradação ou perda de carboidratos após o processo de pré-tratamento, no qual é possível analisar a concentração de açúcares redutores presentes no filtrado; a não eficiência do pré-tratamento, mantendo a morfologia da amostra inalterada, na qual sugere-se a microscopia eletrônica como forma de analisar a morfologia do material

lignocelulósico antes e depois do pré-tratamento; a formação de compostos inibidores; a inativação da enzima.

Furlan (2008) estudou a hidrólise enzimática tanto da palha como da casca de arroz pré-tratados com base e verificou que as maiores concentrações de açúcares redutores corresponderam a 48 h de reação, assim como observado neste trabalho para o pré-tratamento básico. Para Sukumaran et al. (2009), que estudaram o tempo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase, constataram que em 48h de reação alcançaram a maior concentração de açúcar redutor quando comparada com o tempo de 24 h.. Segundo esses autores, as celulasas apresentam como característica a lenta degradação dos polissacarídeos celulósicos e precisam penetrar no polímero para hidrolisá-lo, a fim de atingir o sítio-ativo.

Sun e Cheng (2002) estudando o tratamento de madeiras concluíram que os pré-tratamentos alcalinos são mais eficientes se comparados com a radiação e a explosão a vapor, assim como Sukumaran et al. (2009), que utilizaram o pré-tratamento ácido e básico verificaram que o tratamento com álcali apresentou o maior rendimento em açúcares fermentescíveis quando comparado com o tratamento ácido, igualmente observado neste trabalho.

## 5 CONCLUSÃO

Com este trabalho conclui-se ser viável a produção de etanol a partir da casca de arroz uma vez que é possível quebrar esta estrutura e obter açúcares fermentescíveis.

No caso de comparar os tipos de pré-tratamentos a melhor concentração de glicose foi obtida a partir da amostra que passou pelo processo de pré-tratamento básico seguido da hidrólise enzimática, porém é importante notar que a concentração de açúcares redutores foi muito baixa.

Este trabalho é um dos primeiros na instituição, como perspectiva futura sugere-se:

- Testar concentrações diferentes de ácido e base.
- Encontrar um tempo ótimo visando o melhor resultado que possa gerar o menor custo.
- Realizar análises para qualificar os tipos de açúcares presentes nos hidrolisados.
- Realizar microscopia eletrônica por morfologia no material in-natura, após os pré-tratamentos e a hidrólise enzimática.
- Realizar hidrólise enzimática da amostra sem pré-tratar, objetivando calcular o rendimento.
- Verificar a estabilidade da enzima e a possível injeção de um aditivo (enzima) para quebrar a celulose.
- Aprofundar no estudo que justifique o comportamento da concentração de glicose em relação ao tempo de coleta do material.
- Variar a quantidade de enzima empregada na hidrólise objetivando estabelecer uma relação entre a maior produção de açúcar com a utilização da menor quantidade de enzima.
- Fazer novas reações com granulometrias maiores, visando um tamanho ótimo para a indústria.
- Fazer um estudo da viabilidade econômica, avaliando os valores comerciais das enzimas, reagentes, e todos os fatores envolvidos.
- Produzir o álcool

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, V.D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, 2007. Acesso em : 02 jul 2011

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

BNDES, CGEE. Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BUTZKE, A. C.; LINDEMANN, C.; CARVALHO, T.; SCHMIDT, V. W. **Determinação de Açúcares Redutores pelo método do DNS**. Relatório técnico científico, Disciplina de Bioquímica Industrial. Rio Grande, Abril de 2010.

CAMPESTRINI. E., SILVA. V. T. M., APPELT. M. D. **Utilização de enzimas na alimentação animal**. Revista Eletrônica Nutritime. V. 2. Nº. 6, novembro/dezembro 2005.

CARRASCO, F. **Thermo-mechano-chemical pretreatment El Wood in process development unit**. Wood Science and Technologi, v, 26, p. 413-426, 1992.

CGEE. **Bioetanol combustível – uma oportunidade para o Brasil**. Brasília – DF : Centro de gestão e estudos estratégicos, 2009.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de Monascus purpureus**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2007.

DINIZ, J. **Conversão térmica de casca de arroz à baixa temperatura: produção de bioóleo e resíduo sílico-carbonoso adsorvente**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2005. Tese (Doutorado).

DUARTE, H. C. **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado.** Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1989. Tese (Doutorado).

FERRAZ, A. et al. **The use of white-rot decaying as a pretreatment for organosolv delignification of Eucalyptus grand is wood.** Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems, Ottawa, Canadá.1994.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

FURLAN, V. J. M.; MOREIRA, J. B.; SCHMIDT, V. W.; MARGARITES, A.C.; COSTA, J. A. V. **Sacarificação ácida da palha e casca de arroz.** Universidade Federal do Rio Grande- Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), 2008.

GÓMEZ, S. M. R. **Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2010.

HAMELINCK, C. N. et al. **Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term.** Biomass and bioenergy 28 (2005), 384-410.

INGESSON, H.; ZACCHI, G.; YANG, B.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. **The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose.** Journal of Biotechnology, v. 88, p. 177-182, 2001.

IBGE. **Projeção do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 17 abril 2013 às 17:00hs.

IRGA - <http://www.irga.rs.gov.br/> . Acesso em: 17 abril 2013 às 17:00hs.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. **Lignocelulosic biomass processing: a perspective.** International sugar journal, v.106, p.147-150, 2004.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES A. L. **Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa.** Revista de ciências ambientais, Canoas, v.1, n.2, p. 5 a 18, 2007.

MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MENDES, C. H. R. **Dosagem de glicose: método do DNS - Açúcares redutores.** Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Rio de Janeiro. Disciplina: Bioquímica I, 2009.

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

MURPHY, J.D., MCCARTHI, K. **Ethanol production from energy crops and wastes for use as transport fuel in Ireland.** Applied Energy, n. 82, p. 148-166, 2009.

PACHECO, T. F. **Produção de etanol: Primeira ou segunda geração? A importância da produção de etanol.** Embrapa Brasília: Circular teórica 04, 2011.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação Mestrado.

RAMBO, M. K. D. **Aproveitamento da casca de arroz para a produção de xilitol e sílica xerogel.** Santa Maria: Universidade federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, 2009. Dissertação (Mestrado).

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** Revistado BNDES, Rio de Janeiro, n. 32, 2009. Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev3204.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev3204.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2011.

RUEGGER, M. J. S., TAUKE-TOMISIELO. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica. V. 27. Nº. 2, 2004.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. **A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?** Química Nova, vol. 24, nº 2, 247-251, 2001.

SHAN, A. Y. K. V.; MARTINOTTO, C.; GOMES, I. A. C.; MARQUES, T. C. **Obtenção de Curvas padrão para Açúcares redutores, Açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos.** Laboratório de Bioquímica de Plantas. Lavras, 2002.

SILVA, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar.** Trabalho (Graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia de Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

SOUZA, M. F.; BATISTA, P. S.; REGIANI, I.; LIBÓRIO, J. B. L.; SOUZA, D. P. F. **Rice hull-derived sílica: Applications in Portland cement and mullite whiskers.** Materials research, vol. 3, nº 2, 25-30, 2000.

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. **Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts.** Bioresource Technology, v.72, n. 3, p. 253-260, 2000.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production.** Renewable Energy, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review**. *Bioresource Technology*, v. 83, p.1-11, 2002.