

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

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LEVULÍNICO POR MEIO DE
HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daiane Balconi Bevilaqua

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LEVULÍNICO POR MEIO DE
HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ**

por

Daiane Balconi Bevilaqua

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

Orientador: Prof.Tit.Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

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

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LEVULÍNICO POR MEIO DE HIDRÓLISE
ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ**

elaborada por
DAIANE BALCONI BEVILAQUA

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins
(Presidente/Orientador)

Djalma Dias da Silveira, Dr. (UFSM)

André de Lima Cardoso, Dr. (UERGS)

Santa Maria, 08 de fevereiro de 2010.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ayrton pela oportunidade, incentivo e orientação ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Djalma Dias da Silveira pelas valiosas sugestões e pela participação na banca examinadora.

Ao Dr André de Lima Cardoso pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio ao longo do meu percurso.

Ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas, da UFSM, em especial ao prof^o Carlos Malmann, e aos colegas Tibiriçá e Carla pelo auxílio prestado.

Aos colegas do Laboratório LATER: Paulo, Luciane, Marcelo, Daniel, Carla Frank, Franciele, Carlos e Daiane pelo carinho e pelo apoio durante a realização desta dissertação.

Um agradecimento muito especial à Magale e Tiele pela dedicação, confiança e amizade, vocês foram fundamentais para conclusão desse trabalho, muito obrigada.

À colega Juliana Malavolta pela valiosa colaboração neste trabalho e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química em especial aos funcionários Valéria e Ademir.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todas pessoas que de alguma forma, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Dedico aos meus pais Delci e Anadir
e ao meu irmão Michel pela força e
coragem nos momentos difíceis.

RESUMO

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

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LEVULÍNICO POR MEIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ

AUTORA: DAIANE BALCONI BEVILAQUA
ORIENTADOR: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS
Santa Maria, fevereiro de 2010.

O início do século 21 tem se caracterizado por um grande interesse na utilização de matérias-primas renováveis para a produção de insumos e produtos tecnológicos. A esta tendência soma-se à preocupação com a enorme quantidade de resíduos gerada pela sempre crescente produção agrícola. Neste sentido, o aproveitamento das cascas residuais da produção de arroz (CA) - cuja disposição inadequada leva a prejuízos ao meio ambiente, de várias maneiras – pode constituir uma solução ambiental e possível fonte adicional de renda. Neste trabalho utilizou-se a CA como fonte de celulose para o processo de produção de ácido levulínico (AL), intermediário químico muito versátil, com diversas aplicações industriais, produzido, em geral, via síntese química.

A hidrólise da celulose em meio ácido leva à liberação de monômeros de glicose, que, por aquecimento à pressão, se desidrata e forma o intermediário 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) – que, por sua vez, se degrada gerando o AL.

Para o processo de produção do AL, uma fração de 1,00 g de CA, previamente cominuída, selecionada, lavada e seca em estufa, foi hidrolisada com 10,0 mL de HCl 4,5% (v/v) ou de H₂SO₄ 4% (v/v), em batelada, em reator à pressão (51 a 62 atm). A concentração de AL, bem como de 5-HMF, presente no hidrolisado ácido, foram analisadas por HPLC-UV. Já, o resíduo sólido da hidrólise foi caracterizado por meio de MEV e FTIR.

Os efeitos da temperatura, pressão e tempo de hidrólise no processo de produção de AL foram avaliados através de planejamento fatorial utilizou-se metodologia de superfície resposta. Foram feitos dois planejamentos: um para o processo com HCl e outro para o processo com H₂SO₄, mantendo-se constantes a massa da CA e o volume de ácido utilizado. Após otimização do tempo, da pressão e da temperatura reacional, foram estudados os efeitos da concentração de ácido e do pré-tratamento inicial da CA na produção de AL. Foram investigados, assim, os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio, ácido oxálico, extração por soxhlet em meio aquoso e extração por soxhlet com mistura benzeno-etanol 1:1 (v/v).

Verificou-se que a produção de AL é máxima quando o processo hidrolítico foi realizado em temperatura de 160 °C, sob pressão de 53 atm e tempo reacional de 70 min. O melhor catalisador para o processo foi o ácido clorídrico, na concentração de 4,5% (v/v). Entre os pré-tratamentos aplicados à biomassa, a extração aquosa da CA, em soxhlet, levou ao melhor rendimento em AL (59,4%, m/m).

Palavras-chaves: casca de arroz, hidrólise, ácido levulínico.

ABSTRACT

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

ACIDS PRODUCTION BY MEANS OF ACID HYDROLYSIS OF RICE HUSK

AUTHOR: DAIANE BALCONI BEVILAQUA
ADVISOR: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS
Santa Maria, february, 2010.

The beginning of the 21st century has been characterized by a great interest about the use of renewable raw materials for the production of industrial feedstocks and technological products. This trend is followed by the concern about the huge amount of waste generated by the always increasing agricultural production. In this sense, the reuse of the residual rice husks (RH) of the rice production, which by inadequate management affects negatively the environment in several ways, can constitute an environmental solution and a source of income. In this work, it was used RH as a source of cellulose for the production of levulinic acid (AL), a versatile chemical intermediate with many industrial applications, produced usually via chemical synthesis.

The cellulose hydrolysis in acidic medium releases glucose monomers, which by heating under pressure dehydrate and form the intermediary 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) - that, in turn, degraded generating AL. For the AL production, a 1.00 g of RH previously comminuted, selected, washed and dried in an oven, was hydrolyzed with 10.0 mL of HCl 4.5% (v/v) or 4% H₂SO₄ (v/v) in a batch reactor under pressure (51 to 62 atm). The concentration of AL, as well as of 5-HMF, present in the acidic hydrolysate, were analyzed by HPLC-UV. The solid residue of the hydrolysis was characterized by SEM and FTIR.

In order to evaluate the effect of the variables temperature, pressure and hydrolysis time on the yield of the process of AL production, two factorial designs were performed: one, for the process using HCl, and another for the process using H₂SO₄, keeping constant the mass of RH and the used acid volume. After optimization of the time, pressure and temperature of hydrolysis, it was studied the effects of the acid concentration and of the RH pre-treatment on the production of AL. It was investigated, therefore, the pre-treatment with hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, oxalic acid, Soxhlet extraction in aqueous medium and Soxhlet extraction with a mixture of benzene-ethanol 1:1 (v/v).

It was verified that the AL production is maximum when the hydrolytic process was carried out at temperatures 160 °C, under pressure of 53 atm and reaction time of 70 min. The best catalyst for the process was hydrochloric acid at a concentration of 4.5% (v/v). Among the pre-treatments applied to the RH, the Soxhlet aqueous extraction provided the best yield of AL (59.4%, w/w).

Keywords: rice husks, hydrolysis, levulinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma dos subprodutos do beneficiamento do arroz.	18
Figura 2- Esquema simplificado da composição da parede celular.	21
Figura 3- Estrutura da celulose, formada por unidades de glicose.	22
Figura 4- Hidrólise da celulose liberando unidades de glicose.	23
Figura 5- Estrutura dos principais açúcares que compõem a hemicelulose.	24
Figura 6- (a) Monômero de lignina. (b) Complexo ligninocelulósico.	25
Figura 7- Álcoois formadores da molécula de lignina.	26
Figura 8- Processos de separação das frações constituintes da biomassa.	28
Figura 9- Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.	29
Figura 10- Principais produtos formados a partir da hidrólise.	33
Figura 11- Mecanismo proposto para conversão de hexoses em AL.	34
Figura 12- Estrutura do ácido levulínico.	35
Figura 13- Derivados potencialmente interessantes do ácido levulínico.	37
Figura 14- Estrutura do 5-hidroximetil-2-furfural.	39
Figura 15- Fluxograma dos procedimentos, testes de caracterização e análise a biomassa (CA) e os produtos da hidrólise ácida.	43
Figura 16- Sistema Berghoff à pressão usado no processo hidrolítico da CA.	47
Figura 17- Espectro de FTIR da CA antes e após a hidrólise ácida.	56
Figura 18- Micrografias da epiderme externa da casca de arroz com aumento de 500 vezes.	58
Figura 19- Cromatograma de uma amostra do hidrolisado de CA.	60
Figura 20- Cromatograma de uma solução padrão de AL.	61
Figura 21- Cromatograma de uma solução padrão de 5-HMF.	61
Figura 22- Cromatograma de íons extraídos adquirido pela injeção da solução padrão de AL.	62
Figura 23- Cromatograma de íons extraídos adquirido pela injeção da amostra do hidrolisado de CA com os fragmentos de quantificação e confirmação.	63

Figura 24- Cromatograma de íons totais adquirido pela injeção da amostra do hidrolisado de casca de arroz.....	63
Figura 25- Espectro do fragmento de m/z 115.	64
Figura 26- Espectro do fragmento de m/z 180.	64
Figura 27- Espectro do fragmento de m/z 126.	65
Figura 28. Espectro do fragmento de m/z 150.....	65
Figura 29- Superfície de resposta segundo modelo quadrático para a produção de AL.....	68
Figura 30- Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento CCD montado para o processo de produção de AL.	69
Figura 31- Efeito da concentração do ácido sulfúrico na produção de AL.....	71
Figura 32- Efeito da concentração do ácido clorídrico na produção de AL	72
Figura 33- Efeito do pré-tratamento da biomassa no rendimento em AL.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química da casca de arroz.....	20
Tabela 2- Constituição percentual de compostos inorgânicos na cinza da CA.	21
Tabela 3- Propriedades do AL.....	35
Tabela 4- Normas utilizadas para determinação dos respectivos parâmetros.	48
Tabela 5- Condições cromatográficas utilizadas na determinação do AL e 5-HMF.....	51
Tabela 6. Condições cromatográficas usadas na determinação de AL por LC-ESI-MS/MS.	52
Tabela 7- Resultados da análise imediata da casca de arroz.	55
Tabela 8- Figuras de mérito para a determinação de AL.	59
Tabela 9- Figuras de mérito para a determinação de 5-HMF.....	60
Tabela10- Planejamento composto central com 2 variáveis para o processo de produção do AL a partir da hidrólise da CA.	67
Tabela 11- Parâmetros ANOVA para o modelo quadrático do planejamento de superfície de reposta para o processo de produção do AL.....	70
Tabela 12- Composição do hidrolisado da CA em condição otimizada e com diferentes pré-tratamentos.	74
Tabela 13 - Condições ótimas de hidrólise para a produção de AL a partir da CA.	75
Tabela 14- Balanço econômico para a produção de AL e 5-HMF a partir da CA.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AL: ácido levulínico

CA: casca de arroz

5-HMF: 5-hidroximetil-2-furfural

RSM: response surface methodology (metodologia de superfície de resposta)

CCD: central composite design (planejamento composto central)

ANOVA: análise de variância

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial

LC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial com ionização eletrospray

C18: sílica modificada com Octadecilsilano

LATER: Laboratório de Pesquisa em Tratamentos de Efluentes e Resíduos

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

SIM: monitoramento de Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

UV: ultravioleta

λ : comprimento de onda

r^2 : coeficiente de determinação

ACN: acetonitrila

MEV: microscopia eletrônica de varredura

FTIR: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivos.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Produção de arroz.....	17
2.2 Casca de arroz.....	18
2.3 Composição química da casca de arroz.....	19
2.3.1 Celulose.....	22
2.3.2 Hemicelulose.....	23
2.3.3 Lignina.....	24
2.3.4 Extraíveis.....	26
2.4 Aproveitamento do material lignocelulósico.....	27
2.4.1 Pré-tratamento da biomassa.....	28
2.4.2 Hidrólise da biomassa.....	31
2.5 Ácido levulínico.....	35
2.5.1 Derivados e aplicações do ácido levulínico.....	36
2.5.2 Produção do ácido levulínico.....	37
2.6 5-hidroximetil-2-furfural.....	39
2.7 Planejamento experimental.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Matéria-prima e preparação do material.....	44
3.1.1 Pré-tratamento da CA através de extração em meio aquoso.....	44

3.1.2 Pré-tratamento da CA com extração em meio orgânico.....	44
3.1.3 Pré-tratamento da CA com água oxigenada, em meio básico.	45
3.1.4 Pré-tratamento da CA com clorito de sódio.	45
3.1.5 Pré-tratamento da CA com ácido oxálico.....	45
3.1.6 Processo de hidrólise ácida.....	46
3.2 Caracterização da casca de arroz e do resíduo hidrolítico.....	47
3.2.1 Análise imediata.....	47
3.2.2 Análises espectroscópicas.....	48
3.2.3 Microscopia eletrônica.....	48
3.3 Determinação da composição do hidrolisado.....	49
3.3.1 Determinação de glicose pelo método enzimático colorimétrico.....	49
3.3.2 Determinação cromatográfica do AL e 5-HMF.....	50
3.3.3 Rendimento.....	53
3.4 Planejamento e otimização de experimentos.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Caracterização da CA e do produto sólido resultante da hidrólise ácida.....	55
4.1.1 Análise elementar.....	55
4.1.2 Espectro de absorção na região do infravermelho.....	55
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura da biomassa.....	56
4.2 Caracterização do hidrolisado.....	59
4.2.1 Determinação de AL e 5-HMF por HPLC-UV.....	59
4.2.2. Determinação de AL por LC-ESI-MS/MS.....	62
4.2.3 Análise da composição do hidrolisado por LC-MS/MS.....	63
4.3 Interação entre as variáveis utilizadas no processo de produção de AL.....	66
4.3.1 Influência da concentração do ácido na hidrólise.....	71
4.3.2 Influência do pré-tratamento da CA no rendimento de AL.....	72
4.4 Balanço econômico aproximado.....	75
4.5 Gerenciamento dos resíduos.....	77
5. CONCLUSÕES.....	78
6. PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A procura por fontes de energia renováveis, alternativas, com o objetivo de diminuir a dependência em relação ao petróleo e frear a crescente contaminação ambiental, causada de forma direta ou indireta pelo uso intensivo de derivados de petróleo, tem se intensificado nas últimas décadas. Sendo uma tendência global, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido do aproveitamento de fontes renováveis para a produção de combustíveis e matérias-primas para a indústria.

Entre os recursos renováveis, as biomassas surgem como uma importante alternativa, não só para desenvolver tecnologias de geração de energia, como também para a produção de outros subprodutos da indústria química, e que hoje, são produzidos basicamente a partir do petróleo.

A grande vantagem na utilização de produtos derivados de biomassa, desconsiderando-se o necessário desenvolvimento científico e tecnológico, decorre do fato dessa matéria-prima apresentar baixo valor agregado e ser abundante. Além disso, resíduos de processos agrícolas, florestais ou industriais, que muitas vezes não teriam uma destinação adequada, podem ser utilizados como fonte de carbono, evitando-se assim, prejuízos ambientais face ao desequilíbrio gerado pelo descarte inadequado desse material.

Uma importante fonte de biomassa residual advém da cultura do arroz. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)¹, o Brasil produz mais de 12 milhões de toneladas de arroz, anualmente, sendo o estado do Rio Grande do Sul (RS) o maior produtor nacional.

O grande volume da produção de arroz gera uma enorme quantidade de rejeito na forma de cascas, geradas durante o beneficiamento. As cascas de arroz (CA) correspondem a aproximadamente 20% do peso das sementes secas, o que faz com que a quantidade produzida atinja milhões de toneladas.

Neste contexto, o aproveitamento de tal rejeito por processos físico-químicos² tem se revelado uma excelente alternativa ambiental e também econômica, uma vez que tal biomassa residual pode vir a ser utilizada como fonte de celulose na produção de ácido levulínico (AL) - Importante produto da degradação da glicose por hidrólise com ácidos diluídos que possui grande importância para os segmentos industriais de alimentos, fármacos e químico, sendo obtido

geralmente via processo químico. Da mesma forma, o 5-Hidroximetil-2-furfural (5-HMF), formado como um intermediário nesse processo de degradação da celulose em AL, é também importante precursor na indústria farmoquímica e petroquímica.

1.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral o aproveitamento da CA por meio de processo físico-químico (hidrólise ácida à pressão), na busca de rota alternativa para a produção de insumos químicos, contribuindo para o esforço nacional de inovação tecnológica e, paralelamente, para a mitigação de problemas ambientais.

Os objetivos específicos são os seguintes:

- Desenvolvimento de processo inovador de produção de AL, e do co-produto 5-HMF, com menor número de etapas e consumo de reagentes, possíveis;
- Desenvolvimento de metodologia analítica qualificada para a quantificação do AL e do 5-HMF no hidrolisado;
- Aplicação de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para a otimização do processo hidrolítico, com vistas a maximizar a produção de AL;
- Avaliação geral da composição química do hidrolisado ácido da CA com vistas à detecção de importantes subprodutos da degradação da celulose, presentes em menor quantidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de arroz

O arroz é uma *Monocotyledoneae*, pertence à família *Poaceae* e ao gênero *Oryza*, de ampla utilização na alimentação humana. É um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. Existem duas espécies cultivadas, o *Oryza sativa*, muito comum nas zonas tropicais e temperadas, e, o *Oryza glaberrima*, originário da África ocidental.

O cultivo do arroz teve início há mais de 7 mil anos, no continente asiático, e hoje ele é um dos cereais mais cultivados no mundo. No Brasil, juntamente com o feijão, desempenha importante papel na composição da dieta básica, sendo parte essencial da chamada “cesta básica” distribuída pelo governo aos estratos mais carentes da população³.

A orizicultura só pode ser feita em locais que ofereçam condições adequadas de clima e solo, condições estas que podem ser encontradas em quase todas as regiões brasileiras⁴.

O Brasil encontra-se na lista dos maiores produtores mundiais de arroz, responsável por 2,25% da produção mundial. Segundo dados da companhia nacional de abastecimento (CONAB)⁵, do total da produção nacional, 88% está concentrada em apenas dez estados. O RS, estado líder na produção nacional de arroz, é responsável por 61% da safra.

O grão de arroz é constituído de casca, película (farelo), germe e endosperma (amido). As vitaminas e sais minerais do arroz estão concentrados na película e no germe. O endosperma contém basicamente amido⁶.

Com o beneficiamento do grão de arroz resultam, em média, 72% de grãos limpos, 8% de farelo e 20% correspondente à casca de arroz (CA)⁷, como podem ser observados no fluxograma mostrado na Figura 1.

Essa condição explica porque o RS, atualmente, é um dos estados brasileiro com maior índice de poluição decorrente da disposição inadequada de resíduos agrícolas.

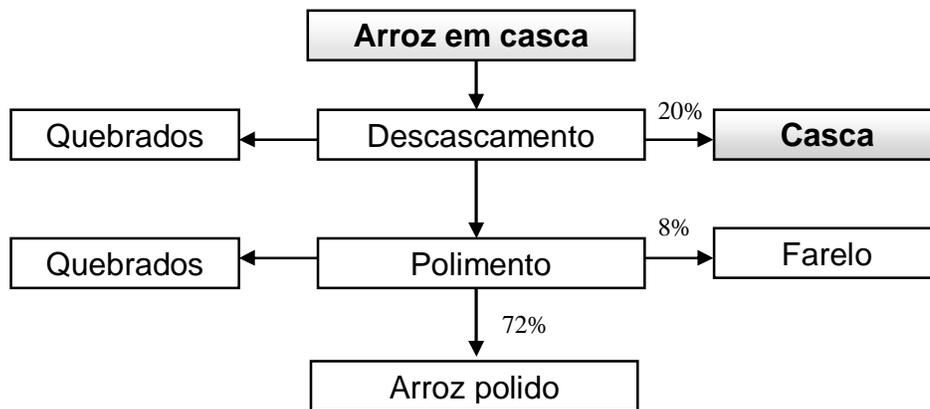


Figura 1- Fluxograma dos subprodutos do beneficiamento do arroz.

Entre os resíduos gerados pelo beneficiamento de arroz, a casca é sem dúvida o mais preocupante, uma vez que o farelo e os fragmentos de grãos são aproveitados na fabricação de farinhas, alimentação animal e na fermentação da cerveja (devido ao seu alto valor nutritivo), enquanto que o principal destino da CA é a queima ou, simplesmente, o seu acúmulo.

2.2 Casca de arroz

Durante o crescimento do arroz há a formação da casca como revestimento ou capa protetora dos grãos. Removidas durante o refino do arroz, estas não possuem valor comercial, particularmente, devido a seu escasso valor nutritivo⁸. Na indústria arroseira têm-se alguns problemas, devido ao grande volume de CA, à baixa densidade desta (0,08-0,16 g cm⁻³), necessidade de espaço para armazenamento, manuseio problemático, elevado custo de transporte e a sua lenta biodegradação^{9,7}, permanecendo em sua forma original por longos períodos de tempo (estimadamente 5 anos)¹⁰, contribuindo para a geração de solo arenoso e de pouca produtividade. Além do mais, acúmulos de grandes quantidades desse material no solo podem causar mudanças no ecossistema¹¹. E, a queima, como forma de eliminação, pode desencadear crises de asma em indivíduos submetidos à exposição¹².

Existem muitas razões para se investir na pesquisa e no desenvolvimento de tecnologias inovadoras, que aproveitem resíduos de descarte problemático. Além de, possivelmente,

contribuir para a redução da dependência de derivados do petróleo, há muitas vantagens para os beneficiadores, que ficam livres do encargo do adequado descarte, bem como para a comunidade, com a criação de empregos e melhor qualidade de vida.

As pesquisas orientadas no sentido de investigar o potencial da CA exploram algumas propriedades interessantes deste material, como a sua capacidade de combustão (em virtude ao seu considerável poder calorífico) e custo praticamente zero. Estudos mais recentes envolvem a utilização de CA na obtenção de combustível gasoso e álcool e, a utilização das cinzas da sua combustão, como adsorvente¹³, aditivo em concreto¹⁴ e materiais poliméricos^{15, 16} e na síntese de zeólitas e silicatos¹⁷.

Pesquisas relacionadas a conversão industrial sustentável de biomassa em produtos de maior valor agregado são bastante escassas e, embora alguns esforços tenham sido dedicados a esse estudo, atualmente não existem projetos industriais que visem a sua exploração em grande escala.

2.3 Composição química da casca de arroz

A CA é composta basicamente por quatro camadas estruturais:

- 1) epiderme externa, coberta com uma espessa cutícula de células silificadas¹⁸;
- 2) esclerênquima ou fibra hipoderme, com parede lignificada;
- 3) célula parênquima esponjosa;
- 4) epiderme interna¹⁹.

Nestas camadas encontram-se componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que a composição química da CA varia de acordo com o tipo de solo e condições de cultura.

Basicamente, os componentes orgânicos encontrados em maior quantidade são: celulose, hemicelulose e lignina. Existem ainda, compostos orgânicos encontrados em menores proporções, que são os extrativos conforme mostrado na Tabela 1. Consideram-se extrativos as gorduras, gomas, alcalóides, resinas, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos²⁰.

Tabela 1- Composição química da casca de arroz.

	Componente% (m/m)	Zanzi ²¹	FAO ²²	Ismail & Walliuddin ²³	Média
Composição química	Celulose	31,3	30,0	32,7	32,1
	Hemicelulose	24,3	25,0	20,5	24,7
	Lignina	14,3	12,0	21,8	16,8
	Cinza	21,7	16,0	17,9	18,1
	Extrativos	8,40	17,0	7,50	10,9
	Componente% (m/m)	Cortez & Lora ²⁴	Martinez et al., ²⁵	Morais ²⁶	Média
Análise elementar	Carbono	41,0	36,6	32,4	36,6
	Nitrogênio	0,40	3,31	n.d	1,23
	Hidrogênio	4,30	5,83	4,29	4,80
	Enxofre	0,02	0,01	n.d	0,01
	Oxigênio*	35,9	36,5	43,3	38,6
	Cinzas**	18,3	17,6	20,1	18,7

* determinado por diferença

**determinado por TG

[n.d] não determinado pelo equipamento (<0,002% em peso).

Observando-se a análise elementar da CA demonstrada na Tabela 1 vê-se outra grande vantagem da CA como matéria-prima na produção de outros materiais: seu baixo teor de enxofre (gerador de SO₂, um dos grandes poluentes atmosféricos).

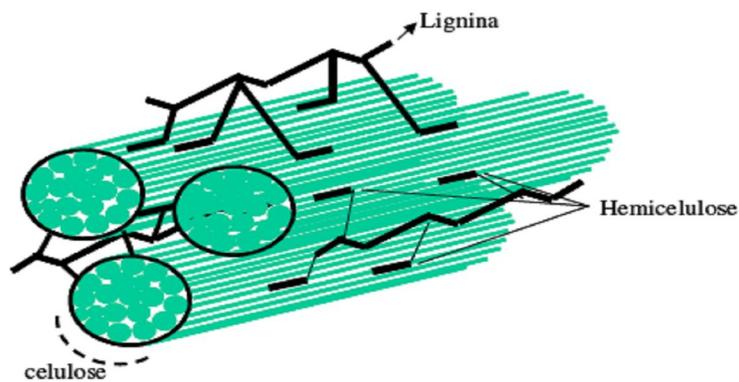
Nas cinzas encontram-se vários compostos inorgânicos, como silicatos, carbonatos, metais e óxidos diversos, sendo a sílica (SiO₂) o constituinte inorgânico encontrado em maior concentração (ver Tabela 2).

Tabela 2- Constituição percentual de compostos inorgânicos na cinza da CA⁹.

Constituinte	Teor% (m/m)
SiO ₂	87,7
K ₂ O	5,40
P ₂ O ₅	3,70
CaO	1,30
MgO	0,80
N ₂ O	0,20
Fe ₂ O ₃	0,10
Cr*	560
Zn*	603

*ppm

A dificuldade de se converter materiais lignocelulósicos em insumos químicos se deve as suas características morfológicas. As microfibrilas de celulose estão envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina (Figura 2)²⁷. Esta matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microorganismos e enzimas, tornando esses materiais lignocelulósicos estruturalmente rígidos e pouco reativos.

**Figura 2-** Esquema simplificado da composição da parede celular.

A compreensão da complexidade estrutural e da reatividade dos materiais lignocelulósicos requer o conhecimento das características e das propriedades de cada um de seus componentes.

2.3.1 Celulose

A celulose é a substância formadora da estrutura esquelética da planta, sendo responsável por dar rigidez e firmeza a estas. Consiste em um polímero formado por unidades de glicose ($C_6H_{12}O_6$), unidas através de ligações químicas do tipo β 1 \rightarrow 4 envolvendo átomos de oxigênio (ligação glicosídica²⁸, Figura 3) , sendo normalmente o constituinte encontrado em maior abundância nas biomassas.

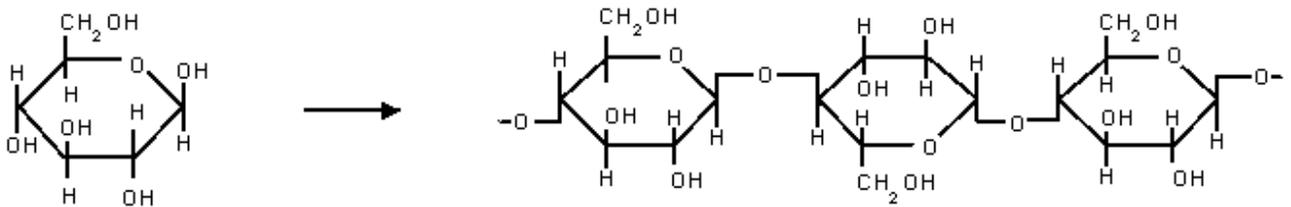


Figura 3- Estrutura da celulose, formada por unidades de glicose.

O grau de polimerização da celulose pode ser da ordem 7.000 a 10.000 monômeros por molécula, o que lhe confere elevada massa molecular. As moléculas de celulose podem se alinhar lado a lado, em cadeias adjacentes, estendidas na mesma direção, formando micelas. As micelas podem se interligar através de pontes de hidrogênio, formando microfibrilas. Estas microfibrilas, com diâmetro médio de 1 a 30 nm, apresentam regiões cristalinas e amorfas. Embora não exista uma separação definitiva entre as duas regiões, há evidências de que as microfibrilas têm um núcleo cristalino rodeado e interrompido por células amorfas. Considera-se que as regiões amorfas sejam formadas pela presença de moléculas de água, que evitam a cristalização da celulose. Ao passo que, as pontes de hidrogênio, inter e intramoleculares são

responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas, tornando a celulose resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática²⁹.

Através de processo de hidrólise a celulose sofre despolimerização, liberando monômeros de glicose (Figura 4), que podem ser utilizados como intermediários na produção de insumos químicos.

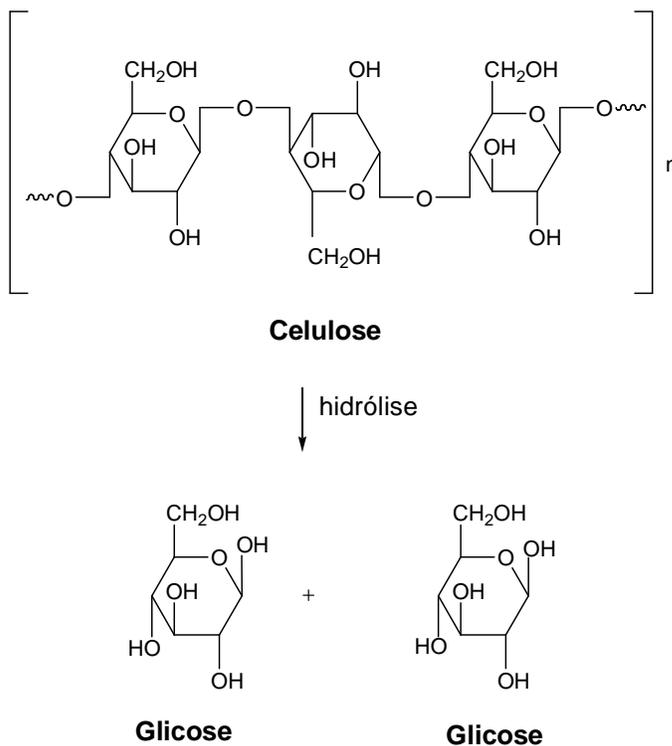


Figura 4- Hidrólise da celulose liberando unidades de glicose.

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses (polioses) estruturalmente associadas à celulose e são depositadas na parede das células em um estágio anterior à lignina, unindo a fração celulósica à lignina. A natureza química das polioses varia, nas plantas, de tecido para tecido e de espécie para espécie. As polioses, ao contrário da celulose, são compostas por vários açúcares como: D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses) e, em maior quantidade, por D-xilose, L-arabinose (pentoses),

podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos, grupos acetila, formando polímeros de estrutura ramificada e de cadeias mais curtas (Figura 5).

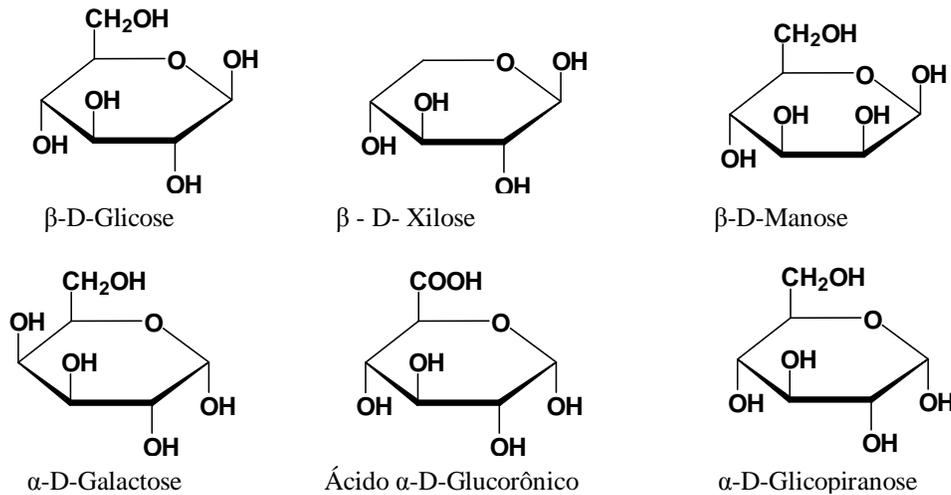


Figura 5- Estrutura dos principais açúcares que compõem a hemicelulose.

As polioses possuem normalmente um grau de polimerização inferior ao da celulose, com 100 a 200 monômeros. Possuindo menor massa molecular e ligações químicas mais fracas, e estrutura amorfa, a hemicelulose é a fração mais susceptível ao tratamento ácido, em que libera açúcares, que podem ser utilizados na produção de insumos químicos - por exemplo, xilitol, produto da fermentação da xilose (constituente majoritário da hemicelulose)³⁰.

2.3.3 Lignina

É um polímero amorfo encontrado na parede celular das plantas, conferindo a estas rigidez, impermeabilidade e resistência aos ataques microbiológico e mecânico; depois da celulose, é o polímero orgânico mais importante e abundante no reino vegetal.

Este componente da parede celular, representado na Figura 6-a, está frequentemente ligado às fibras de celulose na forma de uma substância chamada de complexo lignocelulósico, representado na Figura 6-b.

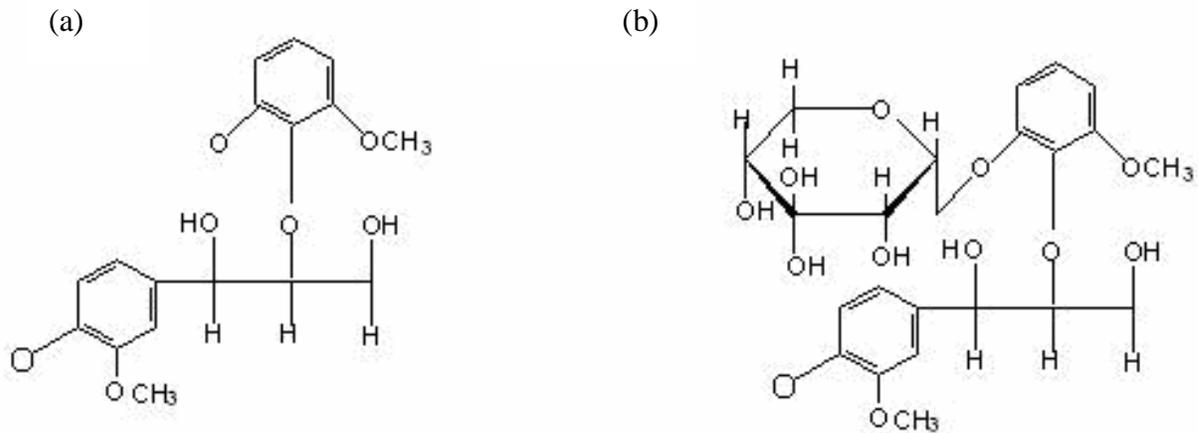


Figura 6- (a) Monômero de lignina. (b) Complexo lignocelulósico.

A lignina possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura preponderantemente aromática. Consiste em um polímero tridimensional de elevada massa molecular, formado pela condensação de unidades do tipo fenil-propano, com crescimento aleatório em direção a uma macromolécula com diferentes tipos de ligações entre os monômeros¹¹. A lignina é formada basicamente por três álcoois, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 7)³¹.

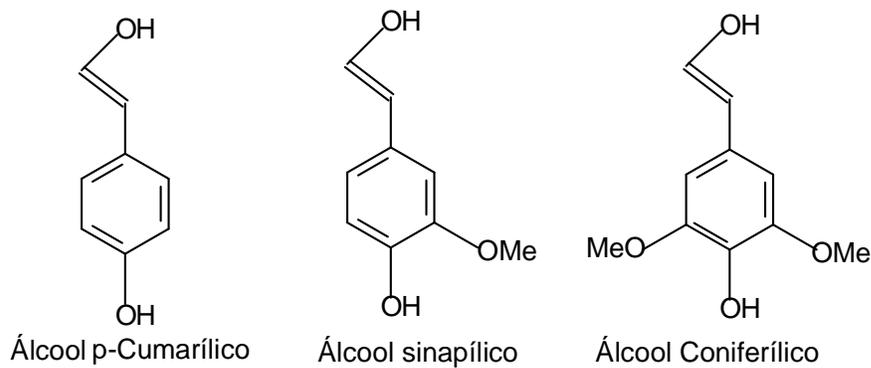


Figura 7- Álcoois formadores da molécula de lignina.

Acredita-se que a formação da lignina deva-se a um processo de oxidação dos monômeros, resultando num polímero repleto de ligações cruzadas, características da lignina. Muitas ligações cruzadas podem ocorrer entre anéis aromáticos ou através de cadeias alifáticas laterais sugerindo não ser possível definir uma única fórmula para a lignina. A fração de lignina pode representar até 40% do peso da biomassa³² (base seca) e possui um interesse especial devido a sua natureza fenólica – em que uma grande variedade de fenóis e núcleos aromáticos são encontrados.

2.3.4 Extraíveis

Os componentes em menor proporção encontrados em biomassas incluem uma variedade de compostos orgânicos, cuja presença relativa é governada por uma série de fatores, entre os quais, os de natureza genética e climática. Estes componentes não estão na parede celular da planta e são conhecidos como extrativos, por serem solúveis em água, solventes orgânicos ou volatilizados a vapor³³.

O teor de extrativos em biomassas varia de 3 a 10% (m/m), sendo estes constituintes responsáveis por determinadas características das plantas, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas³⁴.

Deste modo, os seguintes compostos podem ser encontrados em resinas: estilbenos, terpenos, lignanas, flavonóides e outros aromáticos. Além destas substâncias, outros compostos orgânicos também podem estar presentes nos extrativos, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de elevada massa molar.

2.4 Aproveitamento do material lignocelulósico

Segundo à tendência de biorrefinarias, a separação seletiva de frações constituintes de uma dada biomassa pode viabilizar o uso das frações resultantes para a geração de produtos com maior valor agregado. Dessa forma a celulose, a hemicelulose e a lignina, constituintes de resíduos lignocelulósicos, podem gerar, de uma maneira geral, hexoses, pentoses e derivados do fenilpropano. Destes, em especial, a glicose e a xilose, podem ser convertidos em vários produtos.

Para isto, vários processos têm sido propostos na literatura para a separação das frações do complexo lignocelulósico e melhor aproveitamento das biomassas residuais. Tais técnicas são baseadas em processos biológicos, físico-químicos, ou a combinação destes, dependendo do fim proposto.

Os processos físico-químicos baseiam-se na separação das frações constituintes das biomassas através da utilização de reagentes químicos, com aquecimento e com ou sem auxílio de pressão, para obtenção direta de produtos ou de subprodutos químicos, como açúcares³⁵.

Já, a separação dos constituintes das biomassas em processos biológicos requer a utilização de enzimas específicas como agentes hidrolíticos na quebra das longas cadeias das moléculas de celulose, em açúcares. Na Figura 8 estão esquematizados os processos de separação dos constituintes biomássicos.

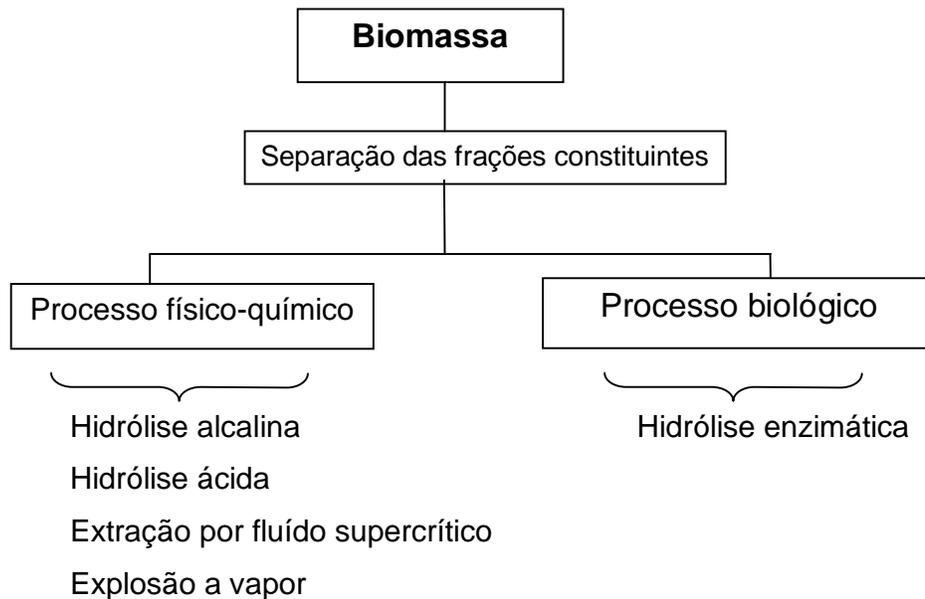


Figura 8- Processos de separação das frações constituintes da biomassa.

A íntima associação que existe entre os três constituintes majoritários da biomassa, com a interveniência de extrativos, confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos, o que vem a dificultar a utilização desta como matéria-prima para processos químicos e biotecnológicos. Por isso são necessárias técnicas de pré-tratamento, que visam à desorganização do complexo lignocelulósico.

Em vista disso, é imprescindível que resíduos agrícolas passem por uma etapa de pré-tratamento, antes da hidrólise, independentemente do processo empregado, a fim de tornar a celulose susceptível à hidrólise.

2.4.1 Pré-tratamento da biomassa

A resistência da celulose à hidrólise é atribuída à fatores como: cristalinidade, área de superfície acessível, proteção da lignina, caráter heterogêneo das partículas da biomassa e o fato da celulose estar revestida pela hemicelulose^{36, 37}. Sendo assim, a soma de todos estes fatores

estruturais e composicionais deve ser levada em consideração. No princípio, um pré-tratamento eficaz causa o rompimento destas barreiras por meio da ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina³⁸. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose, como representado no diagrama esquemático da Figura 9³⁹.

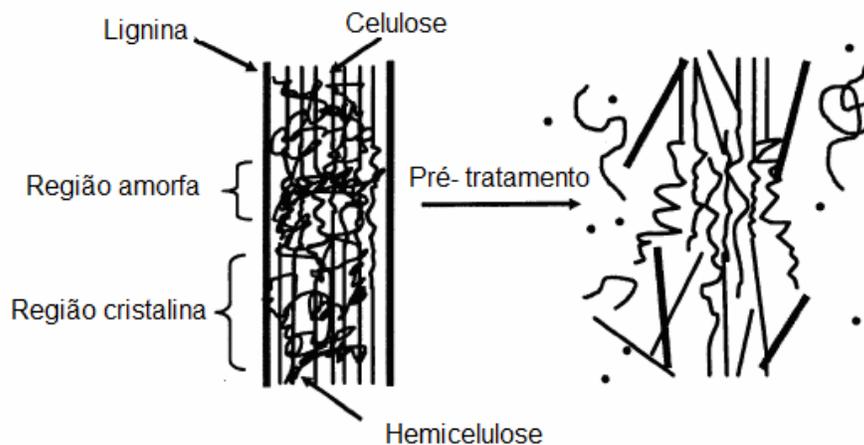


Figura 9- Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.

Existem vários processos de pré-tratamento, que podem ser físicos e/ou químicos - como o tratamento do material lignocelulósico com ozônio, irradiação, ultra-som, álcalis, ácidos, solventes, agentes oxidantes, redutores e outros.

Os pré-tratamentos químicos têm recebido uma maior atenção, já que os pré-tratamentos físicos são, relativamente, ineficientes no aumento da acessibilidade de polissacarídeos aos processos subsequentes⁴⁰.

O pré-tratamento químico remove a lignina, sem degradar a cadeia celulósica. Como a lignina está quimicamente ligada às hemiceluloses, ocorre uma degradação parcial destas durante o pré-tratamento. Além disso, há diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumentando assim a porosidade do material.

Dentre os vários tipos de pré-tratamentos químicos temos o processo oxidativo, em meio básico, que é usado para degradar a lignina tornando assim, o processo hidrolítico mais eficiente. O agente oxidante mais empregado nesse tipo de pré-tratamento é o peróxido de hidrogênio. A adição de base ao peróxido de hidrogênio faz com que a solução se torne um agente efetivo de deslignificação. Isto se deve à formação do ânion hidroperóxido (HOO^-), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, o peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe-se em radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, ao atacar os grupos hidrofílicos, quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina e hemicelulose⁴¹.

As reações envolvidas no processo de deslignificação utilizando peróxido de hidrogênio alcalino são mostradas a seguir: em pH alcalino, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) se dissocia e forma o ânion hidroperóxido (HOO^-) (equação 2.1):



O ânion hidroperóxido pode reagir com o H_2O_2 não dissociado para formar um radical hidroxil altamente reativo ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (equação 2.2):



As reações acima são dependentes do pH do meio; o pH ótimo é 11,5, que é o pK_a da reação de dissociação da água oxigenada (equação 2.3):



Outro tratamento utilizado para a deslignificação de biomassas é feito com solução de clorito de sódio em meio ácido. A deslignificação com clorito de sódio está baseada na reação entre lignina e ClO_2 , ClO^- , produtos estes formados em reações redox de ClO_2^- em meio ácido⁴² (equação 2.4). As reações entre lignina e ClO_2 são exclusivamente oxidativas.



Ambos os processos de pré-tratamento oxidativo propostos apresentam características que podem ser exploradas para a deslignificação da CA, de maneira a favorecer posteriores etapas de aproveitamento de biomassas.

Além do processo de deslignificação, as biomassas podem passar por outros tipos de pré-tratamentos como a extração de compostos que não fazem parte da parede celular da CA e pode oferecer certa resistência a hidrólise.

A extração em meio orgânico, em extrator Soxhlet, utilizando-se benzeno-etanol 1:1 (v/v) visa a eliminação de componentes como: ácidos graxos, resinas, ceras, etc...

Já, a extração em meio aquoso em extrator Soxhlet visa a eliminação de metais (Al, Ca, Fe, Na e Mn) e compostos extrativos hidrofílicos, além de solubilizar parte do dióxido de silício, presentes na composição química da CA.

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) visa a extração de metais presentes na estrutura da CA através da formação de um complexo entre o metal e o ácido oxálico⁴³. Esta etapa facilita, assim, a solubilização da celulose em uma etapa seguinte.

2.4.2 Hidrólise da biomassa

Tratamentos químicos em meio básico usualmente causam degradação da lignina, separando-a da celulose e hemicelulose. Em meio ácido, a tendência é a hidrólise e a solubilização de polissacarídeos.

Algumas bases podem ser utilizadas no processo de hidrólise do material lignocelulósico. A hidrólise alcalina utiliza condições moderadas de temperaturas e pressão em comparação com a hidrólise ácida. O principal efeito deste processo consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade a fibra. O álcali, geralmente hidróxido de sódio ou óxido de cálcio, promove o “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da biomassa decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma⁴⁴.

A hidrólise ácida pode se dar com ácidos concentrados ou diluídos. Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, à baixa temperatura (<100 °C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos resistentes à corrosão, aumentando assim o custo de produção. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose e os monossacarídeos, liberados da hemicelulose, são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais⁴⁵.

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose, podem ser otimizadas. O processo com ácido diluído consiste em submeter ao aquecimento, a biomassa e uma solução ácida, em um reator hermético. São utilizadas temperaturas que variam de 130 a 240 °C, em que soluções de ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e acético podem ser utilizadas como catalisadores para a hidrólise parcial de materiais lignocelulósicos. Em temperaturas superiores a 160 °C há favorecimento da hidrólise da celulose, enquanto que, sob condições mais brandas, há maior conversão da hemicelulose em açúcares fermentescíveis⁴⁶. A hidrólise com ácidos diluídos exige utilização de matéria-prima com reduzido teor de cinzas e impurezas, em virtude do efeito tamponante destas, sendo necessária a lavagem da biomassa antes da hidrólise⁴⁷.

Os ácidos utilizados como catalisadores nos processos de hidrólise liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcares nas cadeias poliméricas. O rompimento destas ligações libera uma série de compostos, principalmente, açúcares como xilose, glicose e arabinose⁴⁸.

São liberados, também, produtos como furfural, da degradação de pentoses, e de 5-HMF, oriundo da desidratação de hexoses, havendo ainda formação de ácido fórmico e de ácido levulínico, produzidos a partir da degradação de 5-HMF¹⁹. Também é gerado ácido acético, dos grupos acetil, de compostos não-estruturais da fração extrativa e produtos de degradação da lignina.

Na Figura 10 tem-se um esquema simplificado dos produtos formados a partir da hidrólise ácida de biomassas lignocelulósicas.

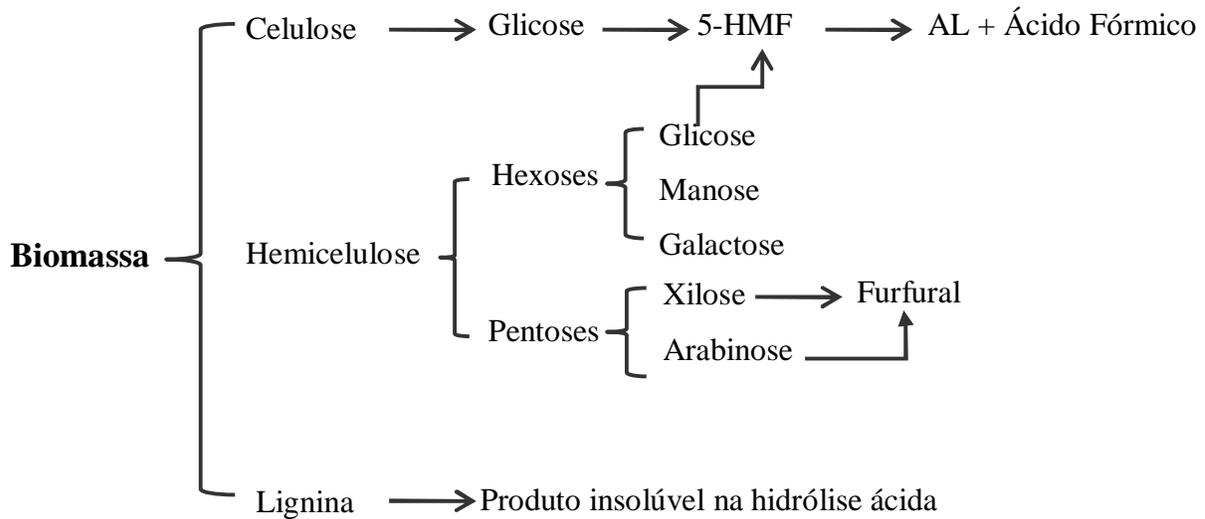


Figura 10- Principais produtos formados a partir da hidrólise.

O AL é o principal produto gerado a partir da hidrólise da glicose, porém, na reação de degradação da glicose é gerado 5-HMF, como um produto intermediário dessa reação.

Um provável mecanismo para a reação de formação 5-HMF e AL está sugerido no esquema da Figura 11. Em meio ácido e em temperaturas próximas a 160 °C, as unidades de glicose liberadas pela degradação da celulose sofrem desidratação intermolecular catalisada por ácido e com isso são convertidas a 5-HMF. Este, em uma segunda etapa, devido às condições do meio reacional, se degrada, levando à formação de AL e, também, de ácido fórmico.

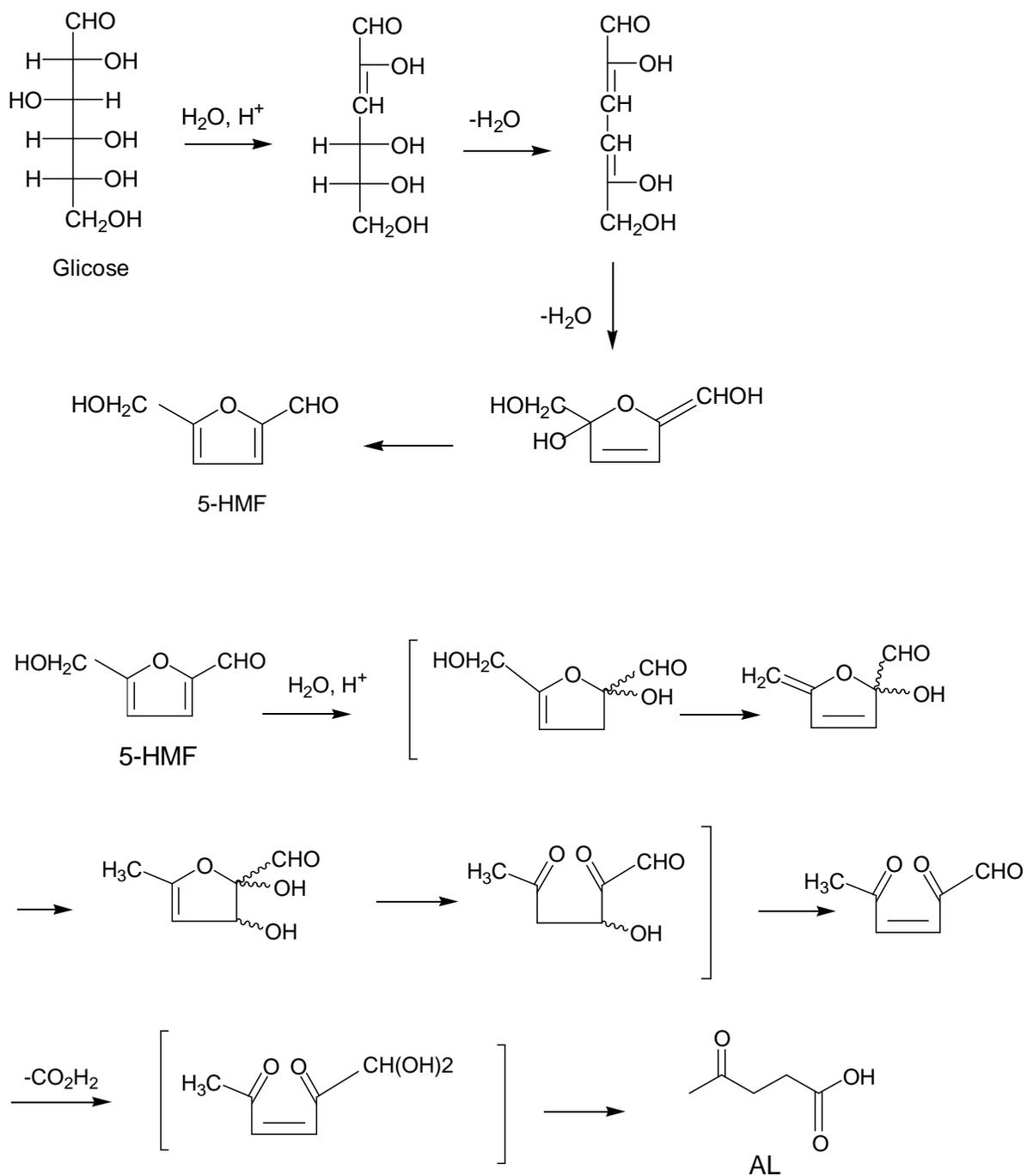


Figura 11- Mecanismo proposto para conversão de hexoses em AL⁴⁹.

2.5 Ácido levulínico

O ácido 4-oxopentanóico ou ácido levulínico (Figura 12) tem sido alvo de muitos estudos por ser produto de fácil produção via sintética e, mais recentemente, via processos envolvendo biomassas.

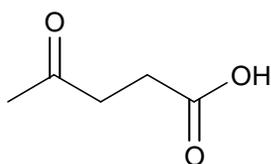


Figura 12- Estrutura do ácido levulínico.

As propriedades do AL dependem em grande parte da sua pureza. Este ácido de baixa massa molecular é altamente polar; como consequência, é completamente ou parcialmente compatível com solventes como água, álcool, cetona, aldeído, ácidos orgânicos, ésteres e éteres. Outra indicação de sua alta polaridade é seu elevado ponto de ebulição. Algumas das principais propriedades físicas do AL são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades do AL⁵⁰

Propriedades físicas	Valores
pK _a	4,59
Ponto de fusão	37°C
Ponto de ebulição	246°C
Índice de refração (20 °C)	1,1447
Densidade	1,14 g cm ⁻³
Tensão superficial (25°C)	39,7 dina cm ⁻¹

2.5.1 Derivados e aplicações do ácido levulínico

Como o AL apresenta as funções cetona e ácido carboxílico, ele pode participar facilmente de reações que envolvem seus sítios eletrofílicos (carbonila e carboxila), separadamente, atuando como 1,4-dieletrófilo e em reações envolvendo os carbonos C2, C3 e C5.

Devido ao fato dos dois grupos metilenos (carbonos C2 e C3) do AL se encontrarem entre uma carbonila e uma carboxila, possuem reatividades diferenciadas, podendo sofrer facilmente reações de cloração e bromação, levando a haletos orgânicos muito úteis como intermediários de síntese.

Uma importante reação envolvendo o grupo carboxila do AL é a esterificação, pois ésteres levulínicos têm vasta aplicação sintética e industrial.

O AL é um intermediário químico muito versátil; puro, pode ter diversas aplicações de grande interesse industrial - na síntese de solventes, pesticidas, polímeros, poliésteres, equipamentos eletrônicos, na produção de material para fotografias e impressão⁵¹. Na síntese de aditivos de combustíveis, tais como 2-metil tetrahidrofurano, um aditivo oxigenado para combustíveis que vem se tornando muito importante⁵². Também é empregado diretamente na indústria de tabaco para reduzir o teor de alcatrão nas frações de nicotina, tornando o sistema respiratório superior menos sensível ao fumo, favorecendo as tragadas mais profundas.

O AL é utilizado ainda na indústria farmacêutica. Derivados do AL têm diversas aplicações no mercado. Por exemplo, o LevulanTM Kerastick (cloridrato do ácido aminolevulínico - ALA HCl)⁴ que é um medicamento obtido a partir do ácido δ -aminolevulínico - ALA (ácido 5-amino-4-oxopentanóico), usada no tratamento de lesões pré-câncer de pele, na face e escalpo^{53,54} em câncer de bexiga em fases I e II, acne e outras⁵⁵.

Benzoazepinonas, por exemplo, podem ser obtidas a partir da reação do AL com anilinas em meio ácido. São medicamentos prescritos como sedativos, hipnóticos, ansiolíticos, relaxantes musculares ou anticonvulsivantes⁵⁶.

Um exemplo de síntese de pirrolidinonas, a partir do AL é a aminação redutiva de Knoop-Osterlin que resulta na formação do aminoácido. Possuem propriedades farmacológicas, como agente antidepressivo e no tratamento da puberdade precoce.

O esquema apresentado na Figura 13 demonstra os principais compostos obtidos a partir do AL.

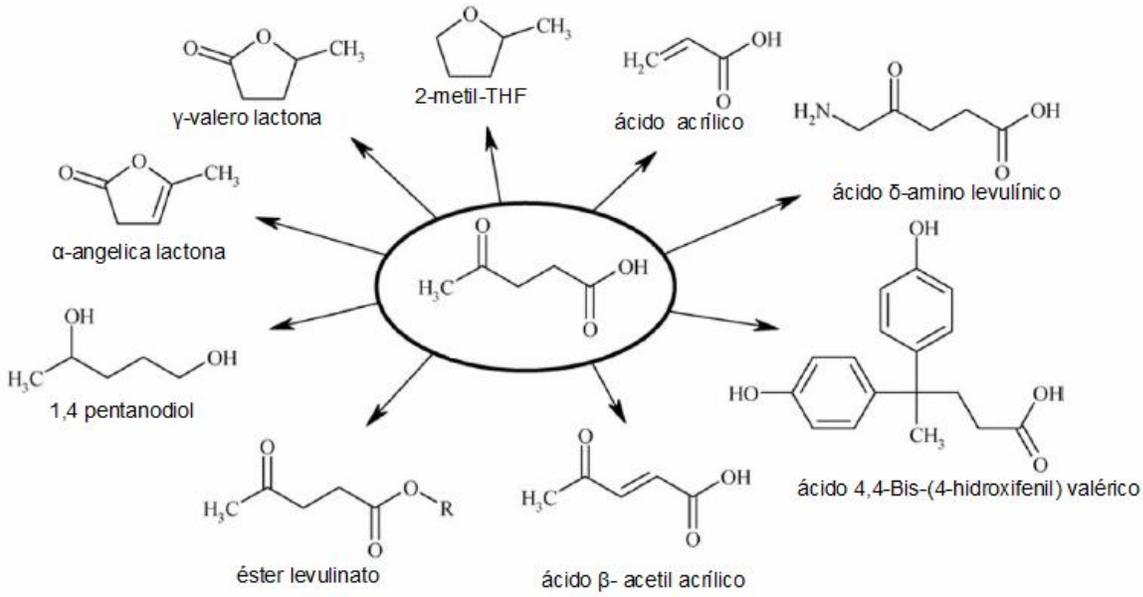


Figura 13- Derivados potencialmente interessantes do ácido levulínico.

2.5.2 Produção do ácido levulínico

O AL tem sido sintetizado desde 1870, por uma variedade de métodos como através da hidrólise de acetil succinato éster⁵⁷, pela hidrólise ácida de álcool furfurílico⁵⁸, por oxidação de cetonas com ozônio⁵⁹ ou com $Mn(OAc)_3$ ⁶⁰. Também pode ser obtido pela carbonilação de cetonas (utilizando Pd como catalisador)⁶¹ e pela alquilação de nitroalcanos⁶². No entanto, esses processos apresentam grande número de etapas, consumo de reagentes caros, o que torna o processo oneroso, conseqüentemente, diminuindo a competitividade do produto no mercado.

Com base nisso, um considerável número de pesquisas estão voltadas para a conversão de biomassa em AL, através da hidrólise térmica de hexoses, ou de carboidratos que contenham hexoses, com ácido mineral diluído por tempos prolongados de reação (Harris, 1975)⁶³. Ácido fórmico e outros subprodutos são também formados nesta reação.

Diversos carboidratos tais como a glicose, sacarose, frutose e galactose^{64, 65, 66, 67} têm sido utilizadas para produzir AL. Os rendimentos foram geralmente inferiores a 70%.

Fitzpatrick et al. (1995)⁶⁸ estudaram o processo de produção de AL a partir de hidratos de carbonos como celulose e amido. No processo, a matéria-prima foi hidrolisada em um primeiro reator à temperatura entre 210-230 °C durante 13-25 s, na presença de 1-5% (m/v) ácido mineral. Este processo produziu 5-HMF, que foi removido para um segundo reator, onde foi hidrolisado à 195-215 °C durante 15-30 min, com ácido mineral a 3-7,5% (m/v) para produzir AL. O rendimento do processo variou entre 60% e 70% (m/m), baseado na concentração de hexose presente na matéria-prima utilizada.

Fang e Hanna (2002)⁶⁹ propuseram um método de obter-se AL utilizando-se grão de sorgo, adicionando-se à biomassa solução aquosa de ácido sulfúrico de 2%, 5%, e 8% (v/v); a mistura foi aquecida à temperaturas de 160 °C e 200 °C durante 40 min em reator com 10 mm de espessura e capacidade para 508 mL, cuja pressão interna pode atingir 95,8 KPa . O rendimento máximo de AL (32,6%, m/m) foi atingido à 200 °C, com ácido sulfúrico a 8% e com relação de 10 mL de ácido para cada grama de biomassa.

Cha e Hanna (2002)⁷⁰ estudaram a produção de AL a partir da hidrólise ácida de amido de milho. O maior rendimento obtido nesse processo foi de 47% (m/m) quando a matéria-prima do processo foi hidrolisada com H₂SO₄ 4% (v/v), a 200 °C, durante 60 min, em um reator PARR 4562, com capacidade de 450 mL (Parr Instruments, Moline, Illinois, USA).

Chang et al. (2007)⁷¹ estudaram os efeitos da concentração do ácido utilizado, o tempo reacional, relação sólido: líquido e a temperatura utilizada na reação de produção de AL a partir da hidrólise da palha de trigo, em reator cilindro de aço inoxidável com 7,5 mm de espessura e capacidade para 125 mL. Sob condições otimizadas de 209,3 °C, concentração do ácido sulfúrico de 3,5% (v/v), taxa de sólidos de 1,0 g para cada 15,6 mL de solução ácida e 37,6 min de tempo reacional, obteve-se um rendimento de 19,86% (m/m) e AL.

Yan et al. (2007)⁷² obtiveram AL a partir da hidrólise de bagaço de cana e palha de arroz, a 220 °C, com ácido clorídrico 4,45% (v/v), durante 45 min, em reator cilíndrico de aço inoxidável de 5 mm de espessura, com revestimento de 4 mm de politetrafluoroetileno, tendo capacidade para 23 mL de solução ácida. Os maiores rendimentos obtidos neste estudo foram 22,8% e 23,7% (m/m), para bagaço e palha, respectivamente.

2.6 5-hidroximetil-2-furfural

O 5-HMF é um intermediário chave na produção de uma larga gama produtos químicos importantes, a partir de fontes renováveis de matérias-primas. Ele é formado a partir da desidratação de hexoses⁷³, sendo um derivado do furano contendo ambas as funções, álcool e aldeído (Figura 14). Tem sido identificado em uma variedade de alimentos processados termicamente, incluindo leite, suco de frutas, aguardentes e mel.

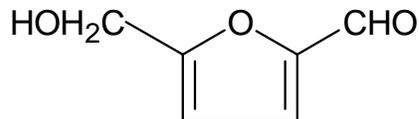


Figura 14- Estrutura do 5-hidroximetil-2-furfural

O 5-HMF, derivado direto da celulose, é um potencial insumo industrial químico. Muitas pesquisas relacionam-se à produção do biocombustível DMF (2,5-dimetilfurano), “neutro” em termos de emissão de carbono, a partir do 5-HMF. O teor energético do DMF (31,5 MJ/L) é semelhante ao da gasolina (35 MJ/L) e 40% maior que a de etanol (23 MJ/L). Além disso, o ponto de ebulição do DMF é 92-94 °C, sendo então menos volátil do que o etanol (78 °C) e imiscível com água. Estas características fazem do DMF uma excelente alternativa de combustível líquido para o transporte⁷⁴. Além de ser utilizado na produção de biocombustível, o 5-HMF também vem sendo estudado intensivamente como matéria-prima para a produção de novos polímeros, que possam ser mais biodegradáveis, devido à origem natural dos compostos furânicos. Também é utilizado na produção do ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDA) através de oxidação catalítica, podendo ser um potencial substituto para o ácido tereftálico, insumo de difícil produção, mesmo através de fontes fósseis e que é usado principalmente na fabricação de polietileno tereftalato (PET), utilizado largamente na produção de embalagens.

O HMF pode ser produzido a partir de biomassas ricas em polissacarídeos através da degradação em meio ácido. O sistema reacional envolve a hidrólise de polissacarídeos em hexoses e a desidratação sucessiva destas em 5-HMF.

Em 2007, pesquisadores do Pacific Northwest National Laboratory (USA) converteram diretamente frutose e glicose em 5-HMF, usando cloreto de cromo como catalisador e, como solvente, um líquido iônico. O rendimento obtido em 5-HMF foi de 90% e 70%, respectivamente⁷⁵⁻⁷⁶. Em abril de 2009, o mesmo grupo relatou um processo de conversão catalítica direta da celulose em 5-HMF obtendo um rendimento de 55%, com pureza de 96%⁷⁷.

Grande esforço científico tem sido feito no sentido de desenvolver novos processos catalíticos para a conversão de sacarídeos em 5-HMF utilizando zeolitas, materiais à base de Ti ou Zr, catalisadores de Nb e cloretos metálicos. Contudo, os resultados da catálise ainda não satisfazem os requisitos necessários para implementação em escala industrial, seja por fatores econômicos (custo do catalisador) ou pelos rendimentos obtidos.

2.7 Planejamento experimental

A otimização de experimentos por meio de métodos multivariados visa o estudo da interação de duas ou mais variáveis experimentais por vez. Dentre os métodos multivariados temos o chamado planejamento fatorial, onde se escolhem as variáveis (fatores) a serem estudadas e efetuam-se experimentos variando-se os valores destes fatores.

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, *Response Surface Methodology*) pode ser entendida como um conjunto de técnicas estatísticas de planejamento de experimentos e métodos de otimização, usadas para analisar problemas com variáveis independentes contínuas em relação à variável aleatória. Os experimentos são repetidos quantas vezes forem necessárias até atingir-se uma superfície ótima, ou seja, o objetivo é buscar a combinação dos fatores que otimizam a resposta. Essa técnica tem larga aplicação nas pesquisas industriais, particularmente, em situações onde um grande número de variáveis de um sistema influencia alguma característica fundamental deste sistema⁷⁸.

O primeiro passo em RSM é definir os limites experimentais a serem explorados, abrangendo um largo intervalo de modo que possa ser obtida uma resposta clara para o modelo. O número de experimentos é dado por $2^K + 2K + n$, onde n é o número de experimentos do ponto central e K é o número de variáveis.

A modelagem normalmente é feita ajustando-se os modelos mais simples, como o linear e o quadrático. Dentre as metodologias de superfície de resposta, uma das mais aplicadas é a do chamado planejamento composto central (ou CCD, *Central Composite Design*).

O modelo de primeira ordem, normalmente, é apropriado quando se está interessado na aproximação da superfície de resposta a uma pequena região do espaço experimental. Para o caso de duas variáveis independentes, o modelo de primeira ordem em termos codificados é demonstrado na equação 2.5.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad (2.5)$$

Esse modelo considera o chamado modelo dos efeitos principais, porque inclui somente os efeitos principais das duas variáveis x_1 e x_2 . Há ainda uma interação entre essas variáveis que pode ser adicionada (equação 2.6), o modelo passa então a ter curvatura na superfície de resposta.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2.6)$$

Muitas vezes essa curvatura na superfície de resposta é forte o suficiente e o modelo se torna inadequado. Para esses casos, o modelo de segunda ordem é comumente requerido. Para o caso de duas variáveis o modelo de segunda ordem é representado na equação 2.7, este modelo é usado como aproximação da verdadeira superfície de resposta em uma pequena região experimental.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_{12} \quad (2.7)$$

O modelo de segunda ordem é largamente utilizado devido ao fato de ser mais flexível, abrangendo grande variedade de formas e funções aproximando-se muito bem da verdadeira superfície de resposta. Outra vantagem do método de segunda ordem é que os parâmetros são facilmente estimados⁷⁹.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os aparelhos e acessórios utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho são parte integrante do Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos – LATER e de outros laboratórios associados da Universidade Federal de Santa Maria.

Os experimentos foram desenvolvidos partindo-se da hidrólise ácida, utilizando-se como substrato a CA residual. Os experimentos foram divididos em duas etapas. Na primeira foi estipulada a metodologia para produção do AL, incluindo a preparação da biomassa e o estabelecimento dos parâmetros da hidrólise (temperatura, tempo reacional, tipo e concentração da solução ácida) - para máximo rendimento do produto de interesse.

A segunda etapa consistiu em caracterizar as frações produzidas nas condições otimizadas, sendo constituída pela análise dos sólidos remanescentes da hidrólise e da fração líquida hidrolisada. O procedimento experimental de processamento e caracterização é mostrado na Figura 15.

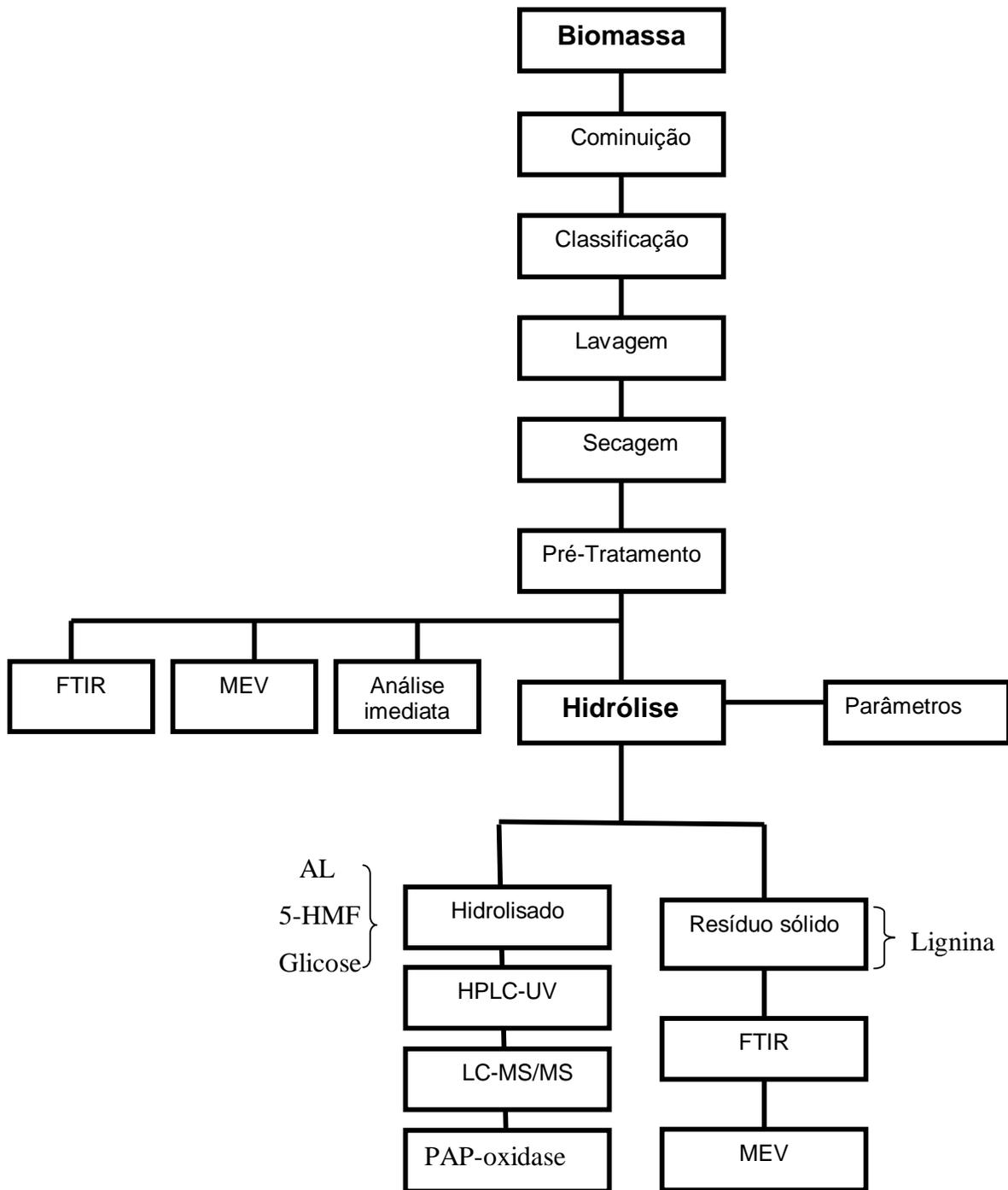


Figura 15 - Fluxograma dos procedimentos, testes de caracterização e análise a biomassa (CA) e os produtos da hidrólise ácida.

3.1 Matéria-prima e preparação do material

A CA utilizada nos experimentos foi fornecida por um beneficiador local. Inicialmente, a biomassa é submetida a um pré-tratamento mecânico para adequar os tamanhos das partículas ao tratamento posterior com ácido diluído. A CA foi cominuída em moinho analítico (Romer Labs), para possibilitar melhor redução da cristalinidade da celulose. As partículas de biomassa foram selecionadas em sistema de peneiras com agitação automática (Bertel, série 8708), com diâmetros de abertura das malhas no intervalo entre 0,18 e 0,30 mm. Lavaram-se as partículas selecionadas com água destilada (até filtrado incolor) e secou-se em estufa (Ideal, série 1.1), à temperatura de 50 °C, durante 24 h, condições suficientes para a eliminação da umidade e obtenção de massa constante da biomassa. Após isto, a biomassa foi mantida em dessecador, sob vácuo, até sua utilização.

3.1.1 Pré-tratamento da CA através de extração em meio aquoso.

A CA lavada e seca foi extraída, posteriormente, durante 12 h, em extrator Soxhlet, utilizando-se como solvente 100 mL de água para 1g de CA. A casca, então, foi seca em estufa (50 °C) até atingir massa constante e mantido em dessecador, sob vácuo. Recuperou-se 95% da massa de partida.

3.1.2 Pré-tratamento da casca de arroz com extração em meio orgânico.

Extraiu-se 1,00g de CA, previamente lavada e seca, durante 24 h, em extrator Soxhlet, utilizando-se 100 mL de benzeno-etanol 1:1 (v/v). Após isto, a casca foi lavada com água destilada, filtrada, seca em estufa (50 °C) até atingir massa constante e mantido em dessecador, sob vácuo. Recuperou-se 93% do material de partida.

3.1.3 Pré-tratamento da casca de arroz com água oxigenada, em meio básico.

Preparou-se uma solução de água oxigenada 1% (m/v) e ajustou-se o pH a 11,5 com solução de NaOH 1M. Uma alíquota de 50 mL desta solução foi adicionada em 1,00 g de CA. A mistura permaneceu em agitação durante 24 horas, à temperatura ambiente.

Após isto, a casca foi lavada com água destilada até pH neutro, filtrada, seca em estufa (50 °C) até atingir massa constante e mantida em dessecador, sob vácuo. Recuperou-se 73% da massa de partida.

3.1.4 Pré-tratamento da casca de arroz com clorito de sódio.

Uma amostra de 1,00 g de CA foi suspensa em 50 mL de uma solução de clorito de sódio 2% (m/v) e ácido acético glacial 0,4% (v/v). A mistura permaneceu sob agitação à temperatura de 80 °C durante 2 horas.

Após isto, a casca foi lavada com água destilada até pH neutro, filtrada, seca em estufa (50 °C) até atingir massa constante e mantida em dessecador, sob vácuo. Recuperou-se 78% do material de partida.

3.1.5 Pré-tratamento da casca de arroz com ácido oxálico.

Uma amostra de 1,00 g de CA foi suspensa e agitada durante 2 horas, à temperatura ambiente, com 10 mL de uma solução de ácido oxálico 0,1 M. Após isto, a casca foi lavada com água destilada até pH neutro, filtrada, seca em estufa (50 °C) até atingir massa constante e mantida em dessecador, sob vácuo. Recuperou-se 82% da massa de partida.

3.1.6 Processo de hidrólise ácida

Para o processo de hidrólise ácida, adicionou-se 1,00 g de CA previamente tratada a vaso de teflon com capacidade de 250 mL; em seguida foram acrescentados 10,0

mL do catalisador ácido: HCl 4,5% (v/v) (Yan et al., 2007)⁷² ou H₂SO₄ 4% (v/v) (Cha e Hanna, 2002)⁷⁰. O recipiente fechado foi acondicionado em morteiro de aço inox e aquecido em sistema específico para tal (Sistema de Abertura de Amostras à pressão Berghoff, Berlim, Alemanha), conforme pode ser observado na Figura 16. O uso de pressão auxilia na decomposição da celulose e dispensa o uso de temperaturas mais elevadas, necessárias no caso de reator não pressurizado. A pressão exercida no interior do vaso de teflon foi calculada através da equação para gases reais (equação 3.1)⁸⁰.

$$\left[P_2 + a \left(\frac{n}{V} \right)^2 \right] (V - nb) = n.R.T \quad (3.1)$$

Onde, n é o nº de mols, V o volume do recipiente (L), R a constante dos gases (0,0082 atm L K⁻¹ mol⁻¹), T a temperatura (K). As constantes de Van der Waals a (5,464 atm L² mol⁻²) e b (0,03043 L mol⁻¹), são correções estabelecidas a equação dos gases ideais, sendo parâmetros ajustáveis característicos de cada gás, neste caso estabelecidos para o vapor d' água. A constante a está relacionada com as forças de atração intermoleculares e a constante b está relacionada com o volume molecular.

O tempo e a temperatura de hidrólise foram trabalhados de acordo com o planejamento fatorial, com vistas ao maior rendimento em produtos da degradação da glicose. A pressão exercida pelo sistema variou de 51 a 62 atm conforme a temperatura empregada (155 a 185 °C).

Decorrido o tempo de hidrólise ácida, as amostras foram filtradas em filtro qualitativo faixa azul, JP42 (www.jprolab.com.br), separando assim o hidrolisado da fração não degradada (lignina). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A fração líquida obtida foi, então, diluída e analisada por HPLC-UV e LC-MS/MS a fim de determinar-se a concentração obtida de AL e, também, de 5-HMF, uma vez que este produto, de importante valor industrial e comercial, é um co-produto no processo de produção de AL.

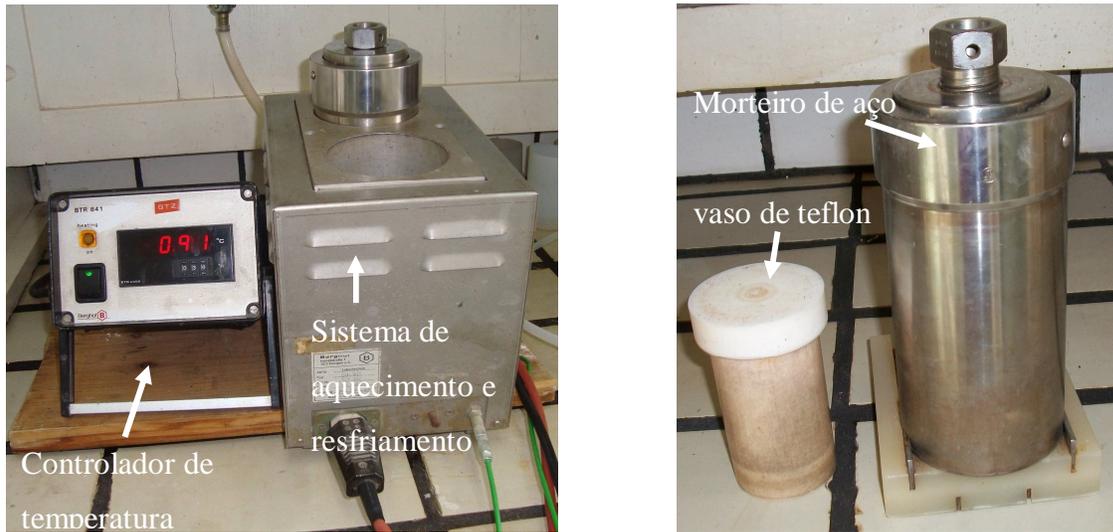


Figura 16 – Sistema Berghoff à pressão usado no processo hidrolítico da CA.

3.2 Caracterização da casca de arroz e do resíduo hidrolítico

A composição química da CA foi estudada através de análise imediata e de espectroscopia de infravermelho (FTIR); também foi avaliada a composição do sólido residual da hidrólise ácida através da espectroscopia de infravermelho (FTIR). As características morfológicas da CA e também do resíduo hidrolítico foram avaliadas pela análise microestrutural através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.1 Análise imediata

A análise química imediata oferece as frações, em peso, de qualquer combustível sólido. Submeteram-se amostras de CA, em triplicata, à determinação de teor de umidade, voláteis, cinzas e carbono fixo. A análise imediata foi realizada seguindo as normas ABNT, descritas na Tabela 4, sugestão do guia prático de análise imediata de combustíveis sólidos.

Tabela 4- Normas utilizadas para determinação dos respectivos parâmetros.

Norma utilizada (ABNT)	Parâmetro medido
NBR8290	Voláteis
NBR8289	Cinzas
NBR8299	Carbono fixo
NBR8293	Umidade

Os equipamentos e acessórios utilizados nesta análise foram: Forno mufla vertical (Heraeus Electronic); cadinho de porcelana; balança analítica com sensibilidade de 0,001 g; tenaz; placa de amianto.

3.2.2 Análises espectroscópicas

Amostras de CA antes e após a hidrólise ácida foram submetidas a varreduras na faixa espectral entre 200-800 nm a fim de identificar, através dos espectros no Infravermelho, bandas características e, a partir destas, obter informações estruturais sobre o resíduo sólido da hidrólise ácida da CA, e, da casca *in natura*.

As análises de infravermelho foram conduzidas pelo método de pastilha de KBr em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo Bruker tensor 27 (www.brukeroptics.com). Realizou-se 32 varreduras na faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} . Foi utilizado nitrogênio como gás de purga, para eliminar a interferência de vapor de água e gás carbônico, atmosféricos.

3.2.3 Microscopia eletrônica

Amostras de CA tratadas e não tratadas e também amostras do resíduo da hidrólise foram micrografadas em microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram dispostas sobre fita

de carbono, por não possuírem caráter condutor, foram metalizadas com uma fina camada de ouro, sob vácuo, durante 30 s e, após, introduzidas no microscópio eletrônico (Thermo Noran Jeol JSM-6360). As micrografias foram realizadas com ampliação de 800 vezes a fim de se observar as alterações sofrida pela estrutura da CA quando submetida ao pré-tratamento e à hidrólise ácida.

3.3 Determinação da composição do hidrolisado

3.3.1 Determinação de glicose pelo método enzimático colorimétrico

Para a determinação de glicose empregou-se o método enzimático colorimétrico: GLICOSE PAP, utilizando o kit *glicose oxidase* (GOD)⁸¹ (LABTEST Diagnóstica, 2005). O sistema consiste na oxidação da glicose formando peróxido de hidrogênio e ácido glicônico (equação 3.2). O peróxido de hidrogênio formado em presença da peroxidase (POD) reage com a 4 aminoantipirina e fenol, formando a quinonimina, um cromógeno vermelho, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose (equação 3.3).



O procedimento analítico consistiu em adicionar-se à 1,0 mL da amostra hidrolisada de CA, 1,0 mL da solução de reagente enzimático, 4-aminoantipirina e fenol. Fez-se o mesmo procedimento com solução padrão de glicose. As alíquotas formadas foram levadas à banho-maria (37 °C) durante 15 min, juntamente com o branco, contendo somente os reagentes. Logo após, determinou-se a absorbância das amostras em 500 nm, em espectrofotômetro Shimadzu MultiSpec-1501 (www.shimadzu.com.br). O branco foi utilizado para zerar a absorbância.

A concentração de glicose foi determinada em mg dL^{-1} , através da razão entre a absorvância da amostra e a absorvância do padrão⁸².

$$\text{Glicose (mg dL}^{-1}\text{)} = (\text{Absorvância da amostra} \times 100) / \text{Absorvância do padrão}$$

3.3.2 Determinação cromatográfica do AL e 5-HMF

Para a determinação da concentração de AL e 5-HMF no hidrolisado, foi utilizado um sistema de HPLC constituído por uma bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A₅, amostrador automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e Software LC Solution (Shimadzu, www.shimadzu.com). O comprimento de onda de maior absorção detectado para o AL foi de 270 nm e de 280nm para o 5-HMF.

Durante a otimização do método, várias condições e solventes foram testados. A melhor separação foi obtida utilizando uma coluna cromatográfica Mediterranea sea 18 (15 cm X 0,4 cm, d.i 3 μm). A fase móvel empregada foi uma mistura de água e acetonitrila, na proporção 97:3 (v/v) (ambas fases modificadas com 0,1% de ácido fórmico), em modo isocrático com uma vazão de 0,6 mL min^{-1} . O volume de injeção foi de 20 μL para ambos os compostos.

Na Tabela 5 estão as condições cromatográficas usadas, segundo Rodríguez-Bernaldo et al (2008)⁸³, para determinação de ácidos orgânicos com modificações para melhorar a separação do AL e 5-HMF de outros compostos presentes no hidrolisado ácido da CA.

As determinações de AL e 5-HMF no hidrolisado foram realizadas empregando-se o método do padrão externo nos cinco pontos de concentrações. Alíquotas de 10 μL do hidrolisado (filtrado) foram diluídas com água, na proporção 1:100 (v/v), para fixar a concentração dos analitos dentro da faixa de concentração dos padrões utilizados na construção das curvas analíticas.

Como não fez-se necessário nenhuma etapa de clean-up da amostra, após a eluição dos compostos, efetuou-se a limpeza na coluna cromatográfica durante 20 min com a fase móvel água: metanol (50:50, v/v), afim de eliminar qualquer resíduo remanescente do hidrolisado ácido da CA.

Tabela 5- Condições cromatográficas utilizadas na determinação do AL e 5-HMF

	Condições cromatográficas AL (HPLC-UV)	Condições cromatográficas 5-HMF (HPLC-UV)
Coluna	Mediterranea sea18 (15 cm X 0,4 cm, d.i 3 μ m)	Mediterranea sea18 (15 cm X 0,4 cm, d.i 3 μ m)
Fase móvel	H ₂ O (0,1% ácido fórmico): ACN (0,1% ácido fórmico v/v), 97:3, v/v	H ₂ O (0,1% ácido fórmico): ACN (0,1% ácido fórmico), 97:3, v/v
Vazão da fase móvel	0,6 mL min ⁻¹	0,6 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L	20 μ L
Detecção (λ)	270 nm	280 nm
Tempo de retenção	7,2 min	12,4 min

A determinação do AL através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) foi utilizada como uma técnica de confirmação, conforme condições descritas por Sano et al (2007)⁸⁴. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo Agilent Séries 1100 LC (Agilent Technologies, www.chem.agilent.com), equipado com duas bombas binárias, degaseificador, forno para coluna e amostrador automático. Utilizou-se um espectrômetro de massas API 4000 Q-Trap - Applied Biosystems, equipado com fonte de ionização electrospray, operando no modo operando no modo negativo (LC-ESI-MS/MS).

A separação cromatográfica foi efetuada em coluna de fase reversa XDB - C18 (5 μ m; 4.6 x 150 mm). Utilizou-se programa de gradiente combinando as fases móveis A (acetonitrila: 1% ácido fórmico, v/v) e B (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, v/v) utilizando uma programação de 100% A de 0 à 1 min, a razão de 20% de A e 80% de B no intervalo de 1,01 à 6 min e novamente 100% A de 6,01 até 10 min.

Utilizou-se uma vazão da fase móvel de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, um volume de injeção de $5 \mu\text{L}$ e o forno da coluna foi mantido a uma temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados através de infusão direta do padrão analítico. Da mesma maneira, os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados através de análise de injeção em fluxo (FIA) do padrão. Na Tabela 6 pode ser visto resumidamente as condições cromatográficas usadas.

Tabela 6. condições cromatográficas usadas na determinação de AL por LC-ESI-MS/MS.

Condições cromatográficas (LC-ESI-MS/MS)	
Coluna	XDB - C18 ($5 \mu\text{m}$; $4.6 \times 150 \text{ mm}$)
Fase móvel	A (ACN: 1% ácido fórmico, v/v) e B (H_2O : 0,1% ácido fórmico, v/v). 100% A de 0 à 1 min, 20:80 (A:B) no intervalo de 1,01 à 6 min e 100% A de 6,01 até 10 min.
Vazão da fase móvel	$0,8 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de injeção	$5 \mu\text{L}$
Tempo de retenção	5 min

Para desenvolvimento de ambos os métodos cromatográfico investigados foram utilizados padrões de 5-HMF (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ pureza) e AL (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ pureza). A acetonitrila utilizada como fase móvel foi de grau HPLC (Merck) e a água usada foi purificada pelo sistema Milli-Q.

Os demais compostos presentes no hidrolisado ácido de CA também foram investigados a fim de serem identificados. A avaliação se deu por meio de LC-MS/MS conduzida em equipamento Agilent Series 1100 LC (Agilent Technologies, www.chem.agilent.com), acoplado a detector MS Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, www.bdal.com) com fonte ortogonal de ionização eletrospray e íon trap. O mesmo método anterior foi empregado.

3.3.3 Rendimento

Após a determinação da concentração de AL no hidrolisado, calculou-se o rendimento teórico obtido. O cálculo envolveu a concentração da fração celulósica presente em um grama da CA e considerou-se que toda celulose presente na biomassa se degrada em glicose e esta por sua vez em AL. Então o percentual de rendimento teórico pode ser calculado através da fórmula⁸⁵:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Md} \cdot \text{Vh}}{10n}$$

Em que:

- Md = massa determinada (g);
- Vh = volume do hidrolisado;
- n = constante de celulose por g de CA e a relação mássica de glicose por AL.

3.4 Planejamento e otimização de experimentos

A fim de otimizar as condições para a produção de máximo rendimento de AL e 5-HMF, a hidrólise da CA foi feita utilizando um planejamento de composto central. Foi elaborado planejamento 2^2 para os experimentos; as variáveis independentes utilizadas foram temperatura e tempo de hidrólise. Após a etapa de hidrólise, as amostras foram analisadas por HPLC e as concentrações de AL determinadas foram consideradas como valores da variável dependente do planejamento.

Em uma segunda etapa, todos os resultados dos planejamentos obtidos a partir de RSM, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a fim de se testar se a mudança de níveis de um fator ou interação é significativa empregando-se um teste de hipótese para média. A verificação do modelo que melhor se adequou a cada planejamento foi interpretada usando o software STATISTICA 6.0.

Os coeficientes das equações, assim como os efeitos, foram determinados por meio de testes *F* de Fischer, que permite avaliar a significância do modelo. Outra medida de adequação de modelos de regressão é o coeficiente de determinação (r^2), que indica o percentual de variação do resultado - explicada pelo modelo construído.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da casca de arroz e do produto sólido resultante da hidrólise ácida

4.1.1 Análise elementar

Foram determinados parâmetros de umidade, matéria volátil, cinzas e carbono fixo da CA. O parâmetro de carbono fixo foi determinado por diferença dos demais. Os resultados obtidos como pode-se observar na tabela 7 aproximam-se dos encontrados na literatura.

Tabela 7- Resultados da análise imediata da casca de arroz.

Parâmetros	Análise imediata (%)		
	Este trabalho	Literatura ²⁴	Literatura ⁸⁶
Umidade	8,90	9,30	7,90
Matéria volátil	56,2	57,7	59,5
Cinzas	18,1	17,6	17,1
Carbono fixo	16,8	15,4	15,5

O percentual de carbono fixo é um indicativo de qualidade de combustível sólido. Baixo teor de carbono fixo e alto teor de material volátil assim como os apresentados pela CA, implicam em material de queima rápida, o que não é adequado para processos de obtenção de energia.

4.1.2 Espectro de absorção na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho obtidos pela análise da CA e do resíduo da hidrólise ácida são mostrados na Figura 17.

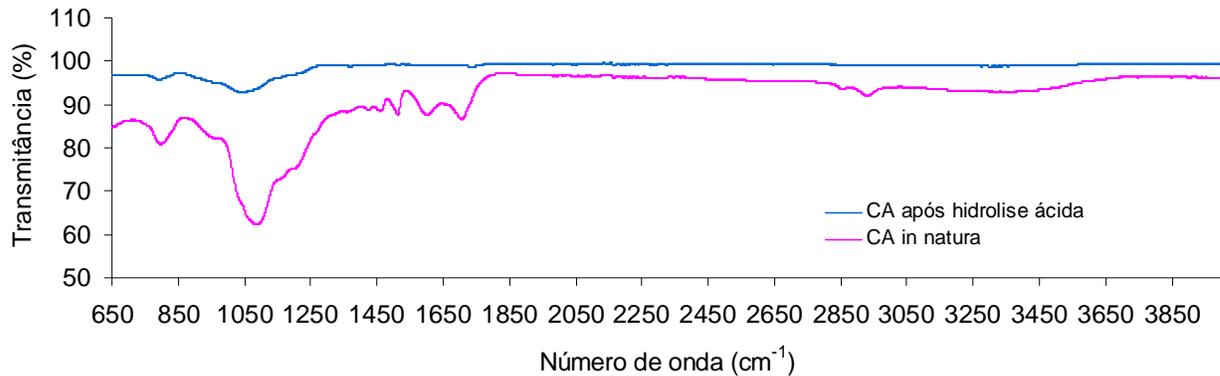


Figura 17- Espectro de FTIR da CA antes e após a hidrólise ácida.

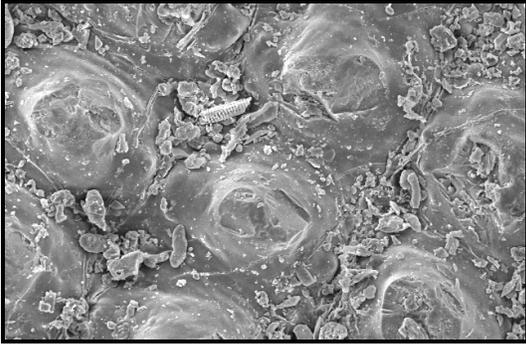
O espectro na região do IR para a amostra de CA *in natura* apresentou banda na região de 2900-3000 cm^{-1} correspondente a estiramento entre C-H em compostos aromáticos, banda na região de 1690-1720 cm^{-1} devido a deformação axial de C=O de cetonas não conjugadas, além de vibrações do esqueleto aromático na região entre 1505-1515 cm^{-1} . Entre 1460-1470 cm^{-1} têm-se ligações C-H em CH_3 e CH_2 . Entre 1086-1128 cm^{-1} pode ser observada banda indicando a deformação de C-O em álcoois secundários. Ainda, a banda observada na região entre 800-810 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento simétrico da ligação Si-O.

Através dos espectros percebe-se que a CA hidrolisada perde grande parte das bandas atribuíveis às diferentes ligações. Não se observa no espectro da casca hidrolisada banda característica de ligações C-H na região entre 1460- 1470 cm^{-1} . Pode-se notar, como na CA *in natura*, as ligações de Si com O, devido ao revestimento de sílica presente na estrutura da casca não ser totalmente degradada pela hidrólise ácida. Além disso, observam-se em ambos espectros a presença de bandas características da deformação de álcoois secundários, C-O (1086 e 1128 cm^{-1}), álcoois estes formadores da estrutura da lignina.

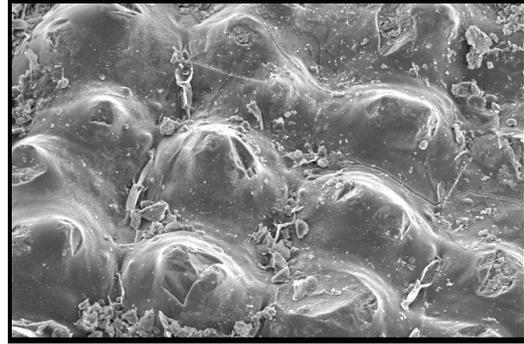
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura da biomassa

A MEV foi feita a fim de verificar o efeito físico para os diversos tipos de pré-tratamento na CA. Além disso, avaliou-se por MEV o efeito do pré-tratamento na casca de arroz e, também,

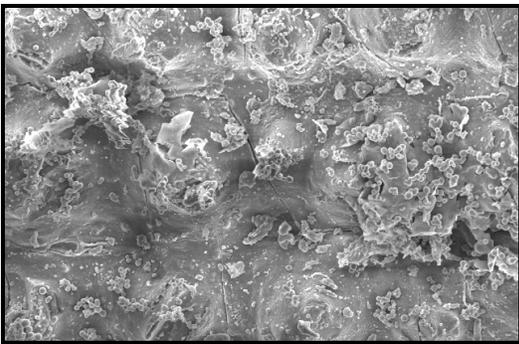
a estrutura do resíduo da hidrólise. As micrografias obtidas, com aumento de 500 vezes, estão apresentadas na Figura 18 (a-g).



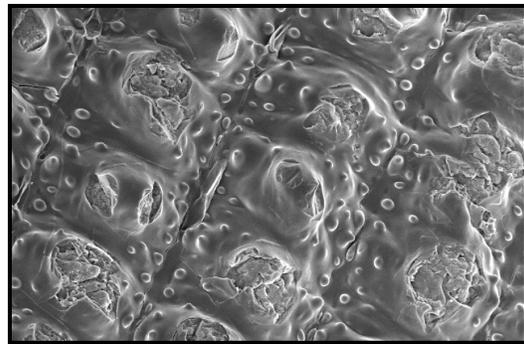
(a) casca *in natura*



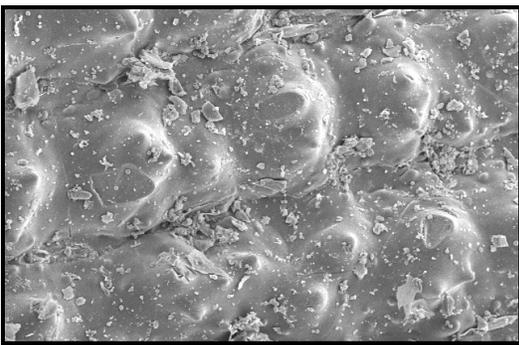
(d) CA tratada com ácido oxálico



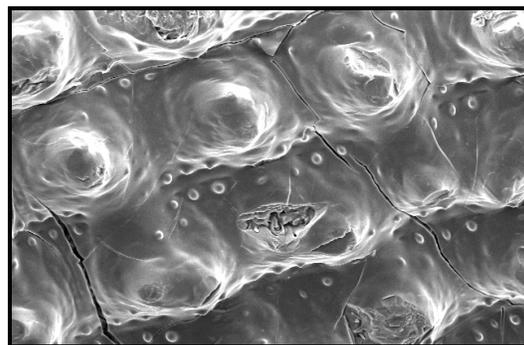
(b) CA após extração com soxhlet tolueno:etanol 1:1 (v/v)



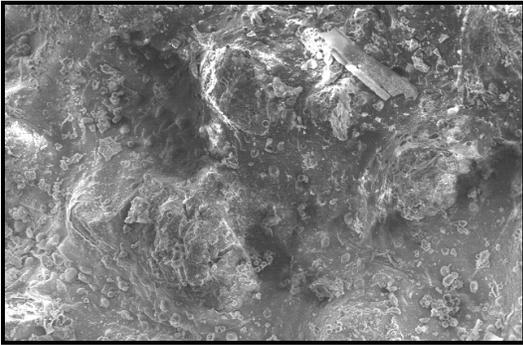
(e) CA tratada com H₂O₂ em meio básico



(c) CA após extração com soxhlet meio aquoso



(f) CA tratada com clorito de sódio



(g) CA *in natura* após hidrólise ácida

Figura 18- Micrografias da epiderme externa da casca de arroz com aumento de 500 vezes.

Na Figura 18-a correspondente a CA sem tratamento prévio, é possível observar a epiderme externa bem conservada, com estruturas celulares revestidas com um material altamente poroso correspondente à sílica. Na Figura 18-b correspondente a casca extraída por soxhlet em meio orgânico, não é possível observar mudanças significativas na estrutura da CA, uma vez que essa extração tem por finalidade a eliminação dos extrativos somente; já na extração por soxhlet em meio aquoso (Figura 18-c) e na CA tratada com ácido oxálico (Figura 18-d) é possível observar que a epiderme externa da CA não está tão revestida como na CA *in natura*, o que torna a estrutura mais facilmente hidrolisável, eliminando substâncias interferentes. As Figuras 18-e e 18-f, obtidas após tratamento com H₂O₂ em meio básico e com clorito de sódio, respectivamente, observa-se a epiderme externa bem organizada, mas com fissuras entre as filas celulares.

De um modo geral é possível observar que, do ponto de vista morfológico, os processos de pré-tratamento parecem afetar igualmente e de maneira branda a casca. O tratamento não chega a atingir a organização celular, principalmente aquelas camadas que possuem células reforçadas por sílica.

Finalmente, na Figura 18-g, correspondente ao resíduo da CA após hidrólise ácida, é possível observar o ataque ácido sofrido pela epiderme externa, ficando evidente a remoção das fibras externas.

4.2 Caracterização do hidrolisado

4.2.1 Determinação de AL e 5-HMF por HPLC-UV

O método de determinação de AL por HPLC-UV foi validado em termos de faixa de linearidade, limites de detecção e quantificação. As Figuras de mérito obtidas estão expostas na Tabela 8. A região de linearidade da curva analítica foi determinada avaliando-se a proporcionalidade entre a resposta do detector e a concentração dos padrões aquosos. As curvas de calibração foram construídas com cinco níveis de concentração. Cada ponto da curva de calibração é média de três medições da área do pico. O coeficiente de determinação obtido para a curva de calibração ($r^2 > 0,9994$) na faixa linear de trabalho de 10 a 2000 mg L⁻¹ evidencia linearidade satisfatória e possibilita desta forma a quantificação do analito pelo método do padrão do externo⁸⁷.

O limite de detecção (LD) foi calculado como o menor nível de concentração no qual o composto estudado foi identificado com uma razão sinal/ruído (S/N)≥3,0. O limite de quantificação (LQ) foi definido como o menor nível de concentração em que o composto apresentou razão sinal/ruído (S/N)≥10. Com auxílio de soluções-padrão de AL foram calculados o LD, de 2,2 mg L⁻¹, e, o LQ, de 7,3 mg L⁻¹.

Da mesma maneira que para o AL, determinaram-se as figuras de mérito para a determinação de 5-HMF por HPLC-UV, expostas na Tabela 9. O coeficiente de determinação obtido ($r^2 > 0,9984$) na faixa linear de trabalho de 0,25 a 150 mg L⁻¹ evidencia linearidade satisfatória. Para o 5-HMF obtiveram-se LD e LQ de 0,12 mg L⁻¹ e 0,4 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 8- Figuras de mérito para a determinação de AL.

Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
10 – 2000	y = 159,7009x + 1433,372	0,9994	2,2	7,3

Tabela 9- Figuras de mérito para a determinação de 5-HMF.

Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
0,25 – 150	$y = 170,674x - 7772,1$	0,9984	0,12	0,4

A Figura 19 apresenta o cromatograma obtido pela injeção de uma amostra do hidrolisado de CA. Os cromatogramas obtidos para a análise de padrões de AL (200 mg L⁻¹) e de 5-HMF (50 mg L⁻¹) estão representados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

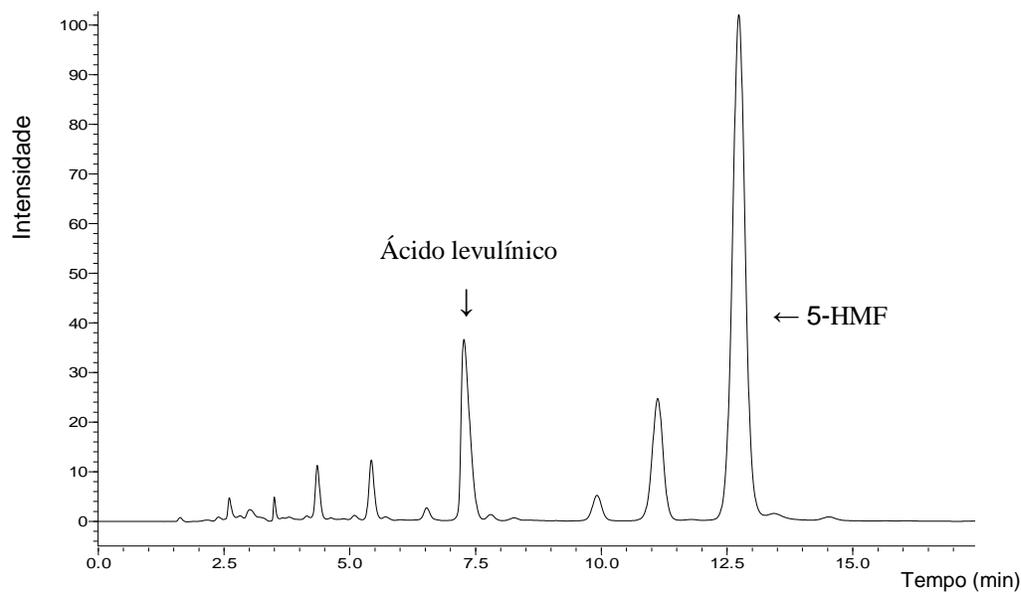


Figura 19- Cromatograma de uma amostra do hidrolisado de CA, diluída 100 vezes em água, obtido com auxílio de coluna mediterranea sea 18 (15 cm X 0,4 cm, d.i 3 µm), eluída em fase móvel constituída por solução aquosa 1% de ácido fórmico : ácido fórmico 1% em ACN (97:3; v/v), com vazão de 0,6 mL min⁻¹.

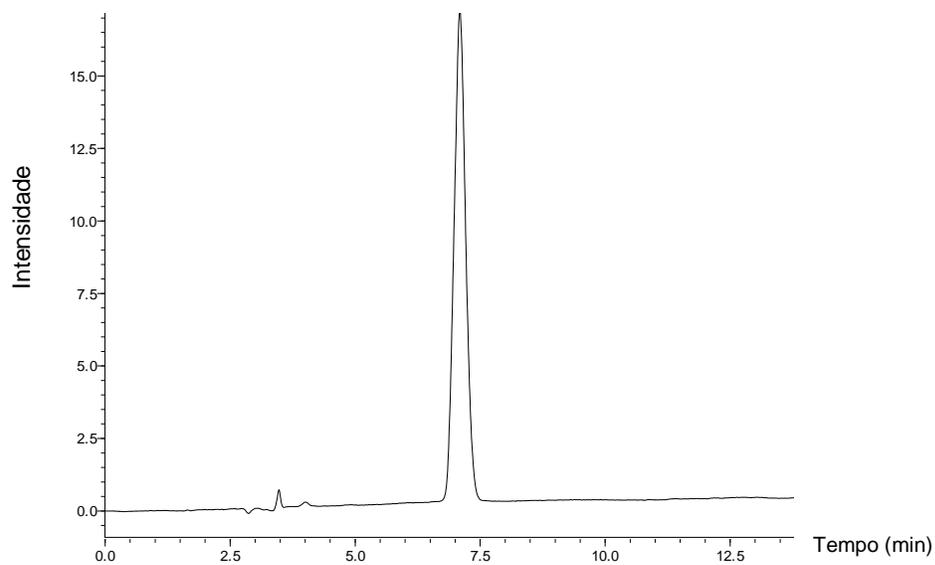


Figura 20- Cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução padrão de AL, eluída nas mesmas condições cromatográficas que as utilizadas para as amostras (ver Figura 19).

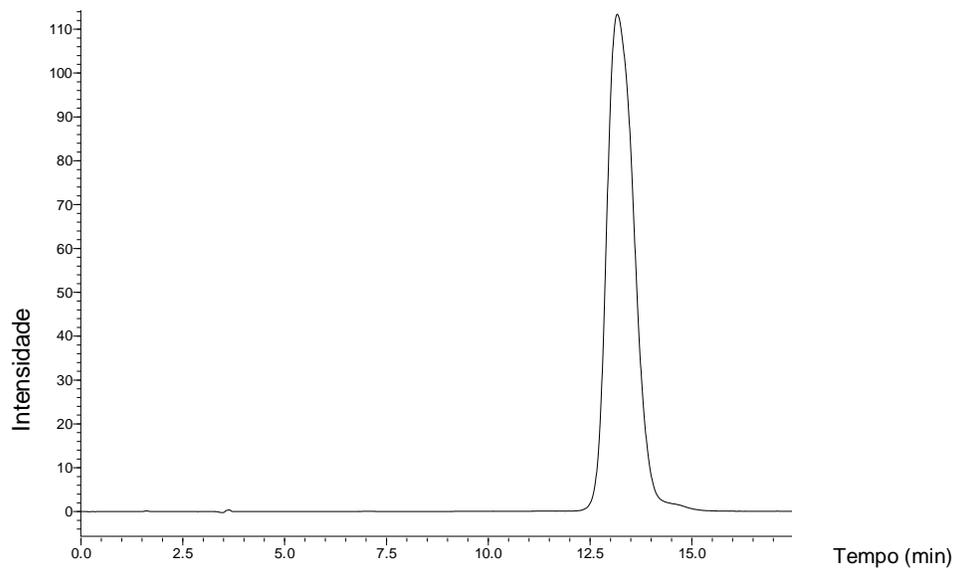


Figura 21- Cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução padrão de 5-HMF, eluída nas mesmas condições cromatográficas que as utilizadas para as amostras (ver Figura 19).

Os cromatogramas demonstram perfis cromatográficos muito semelhantes entre as amostras e os padrões de AL e 5-HMF. Pode-se observar, também, a eficiente separação cromatográfica destes dos demais compostos presentes no hidrolisado de CA.

4.2.2. Determinação de AL por LC-ESI-MS/MS

As curvas de calibração foram construídas com cinco níveis de concentração. Cada ponto da curva de calibração é média de três medições da área do pico. O coeficiente de determinação obtido para a curva de calibração ($r^2 > 0,9991$) na faixa linear de trabalho de 5 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$, evidenciando linearidade satisfatória.

O cromatograma obtido a partir da solução padrão de AL apresentou fragmentos de confirmação e quantificação com sinais em m/z 96,8 e 71,0, respectivamente. A fim de confirmar a presença de AL nos hidrolisados, fez-se análise por LC-MS/MS. A similaridade entre os cromatogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão de AL (200 $\mu\text{g L}^{-1}$) e de uma amostra de hidrolisado de CA (Figura 22 e 23, respectivamente), no tempo de retenção característico do analito (5 min), demonstra a presença de AL no hidrolisado.

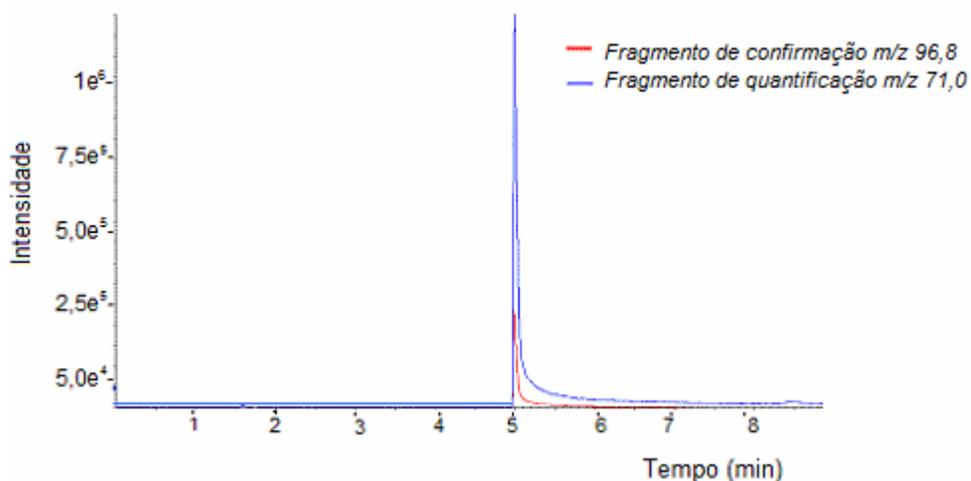


Figura 22- Cromatograma de íons extraídos adquirido pela injeção da solução padrão de AL com os fragmentos de quantificação e confirmação.

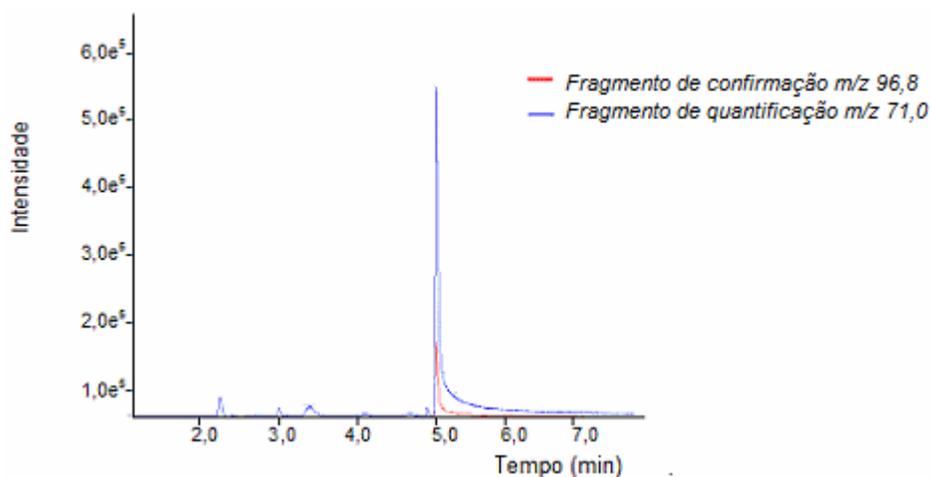


Figura 23- Cromatograma de íons extraídos adquirido pela injeção da amostra do hidrolisado de CA com os fragmentos de quantificação e confirmação.

4.2.3 Análise da composição do hidrolisado por LC-MS/MS

O hidrolisado de CA foi analisado por LC-MS/MS a fim de identificar as principais substâncias presentes em sua composição. O cromatograma de íons totais obtido pode ser observado na Figura 24. Foram feitos os espectros dos principais fragmentos encontrados no cromatograma e estes podem ser observados nas Figuras 25-28.

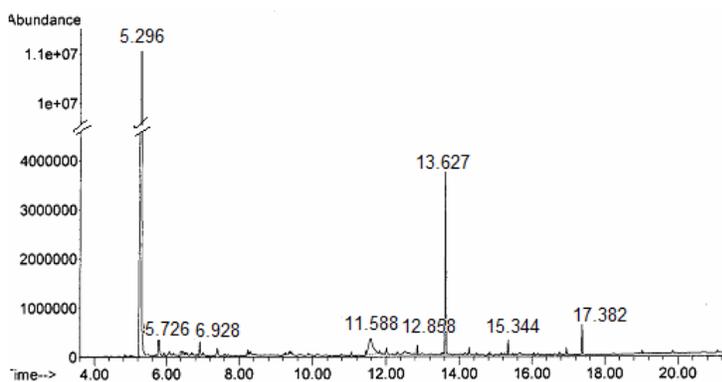


Figura 24- Cromatograma de íons totais adquirido pela injeção da amostra do hidrolisado de casca de arroz.

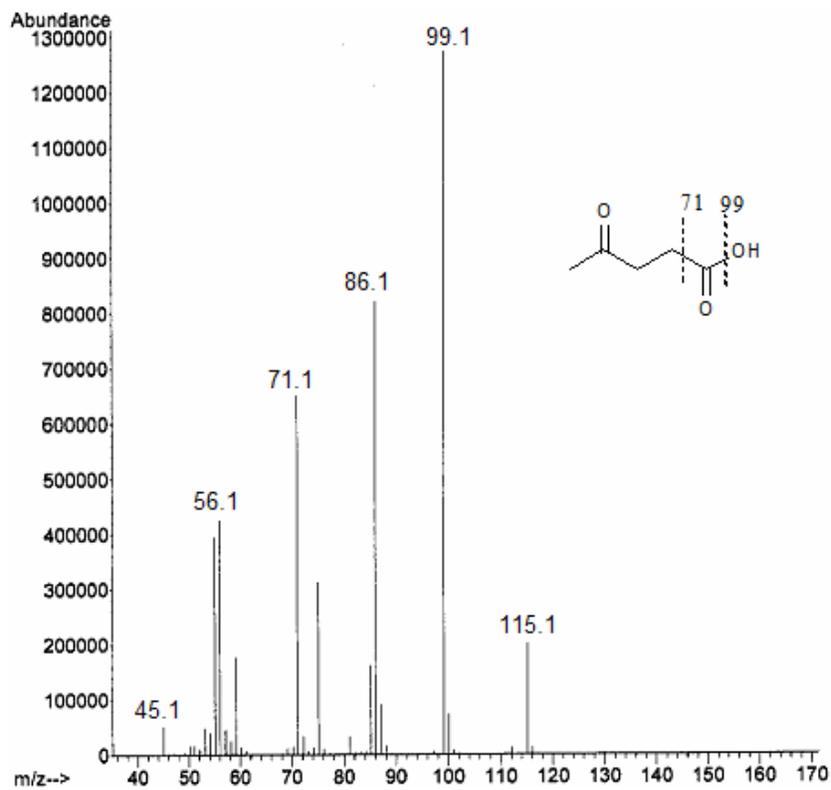


Figura 25- Espectro do fragmento de m/z 115.

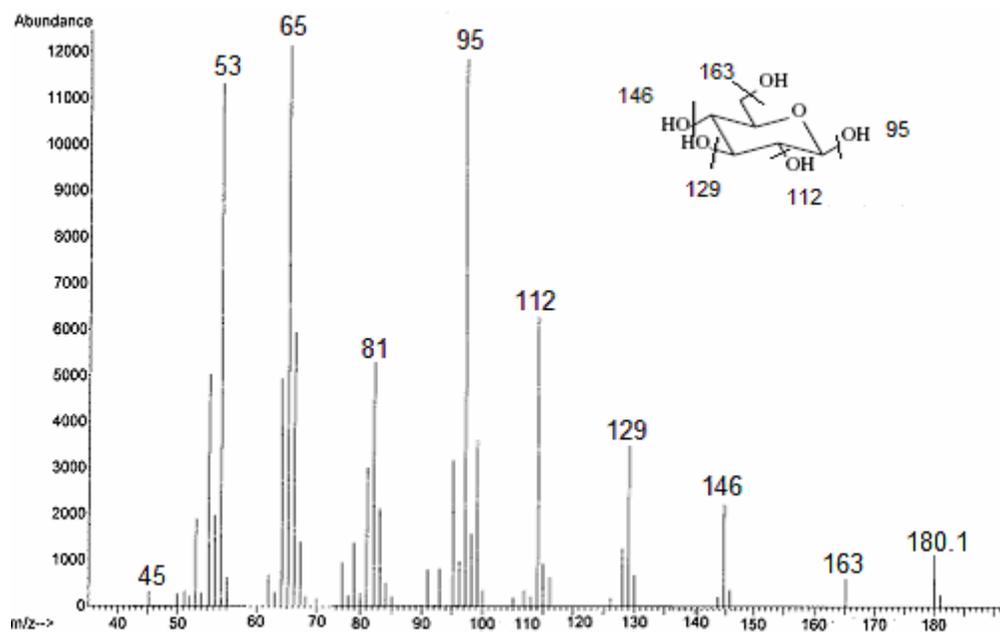


Figura 26- Espectro do fragmento de m/z 180.

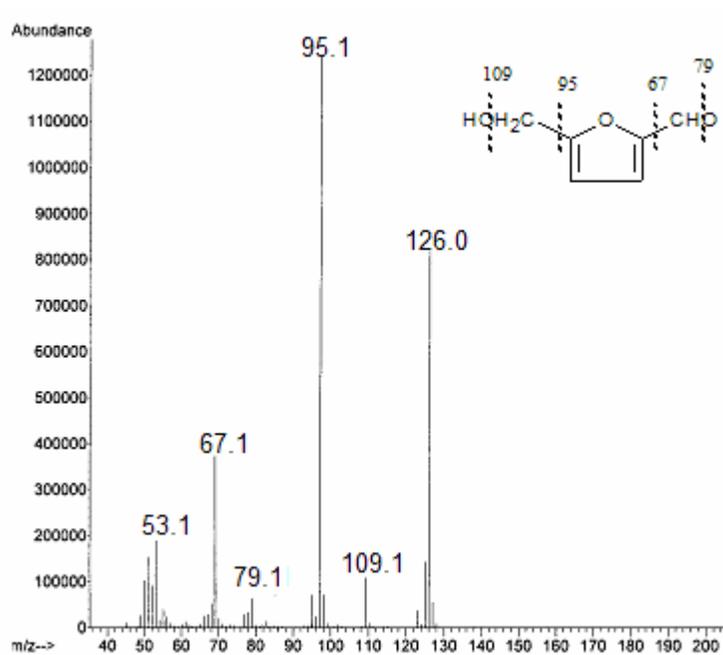


Figura 27- Espectro do fragmento de m/z 126.

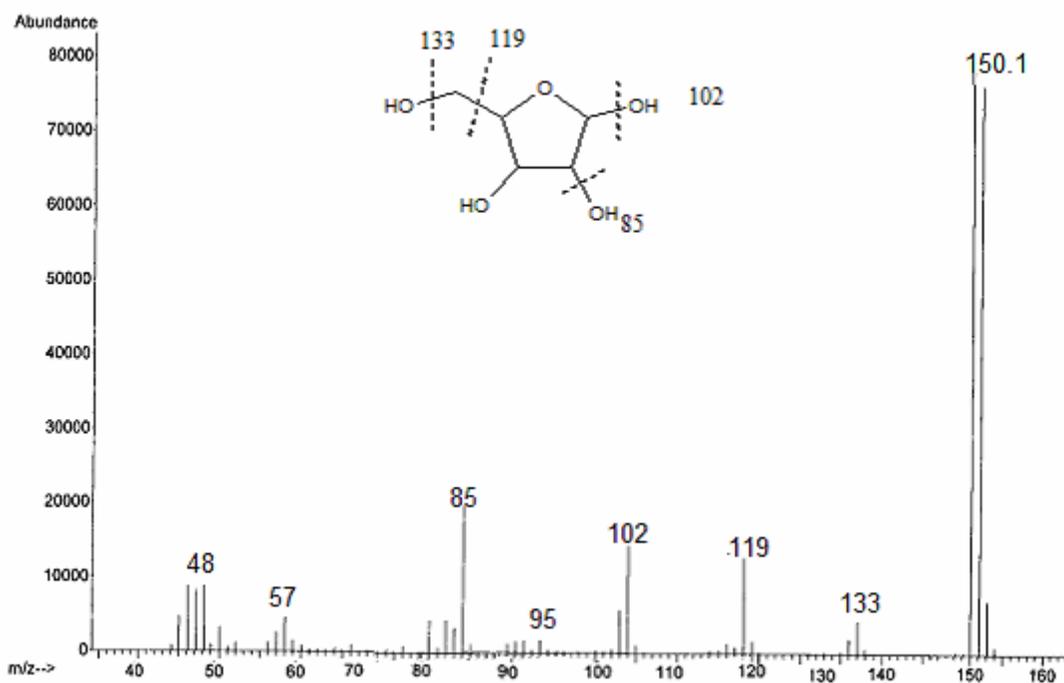


Figura 28. Espectro do fragmento de m/z 150.

O espectro mostrado na Figura 25 é atribuído a molécula de AL, o espectro da 26 é atribuído a glicose; já os espectros representados nas Figuras 27 e 28 são característicos do 5-HMF e da xilose, respectivamente, confirmando que esses compostos são os principais produtos formados a partir da degradação da celulose e hemicelulose, por meio de hidrólise ácida.

4.3 Interação entre as variáveis utilizadas no processo de produção de AL

Para o estudo do processo hidrolítico de produção de AL, foram montados dois planejamentos, um para a hidrólise com HCl 4,5% (v/v) e, outro, com H₂SO₄ 4% (v/v) a fim de avaliar as variáveis do processo e suas influências no rendimento do AL. A hidrólise ácida foi realizada conforme descrito na seção 3.1.6.

De acordo com o planejamento montado para o tratamento com HCl 4,5% (v/v), como pode ser observado na Tabela 10, a maior concentração de AL obtida foi em temperatura de hidrólise de 160 °C, durante 70 min, à pressão de aproximadamente 53 atm, em que obteve-se concentração de 16,7 g L⁻¹ de AL no hidrolisado. Esta concentração representa um rendimento de 54,5% (m/m). Já para o planejamento em que o H₂SO₄ 4% (v/v) foi utilizado como catalisador, a maior concentração de AL obtida por hidrólise à temperatura de 170 °C, durante 60 min, à pressão de aproximadamente 57 atm em que obteve-se concentração de 14,0 g L⁻¹ de AL no hidrolisado, representando rendimento de 45,7% (m/m).

Tabela 10- Planejamento composto central com 2 variáveis para o processo de produção do AL a partir da hidrólise da CA.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
(A) Tempo, min	60	70	90	110	120
(B) Temperatura, °C	155	160	170	180	185

Experimentos	(A)	(B)	HCl 4,5% (v/v)		H ₂ SO ₄ 4% (v/v)	
			Concentração	Rendimento	Concentração	Rendimento
			(g L ⁻¹)	% (mm ⁻¹)	(g L ⁻¹)	% (mm ⁻¹)
1	-1	-1	16,7	54,4	11,9	39,0
2	+1	-1	10,4	33,9	8,4	27,6
3	-1	+1	10,8	35,3	10,8	34,9
4	+1	+1	9,7	31,6	9,9	32,5
5	-1,41	0	15,8	51,6	14,0	45,7
6	1,41	0	9,3	30,4	10,1	33,0
7	0	-1,41	9,5	30,9	10,1	32,9
8	0	+1,41	9,2	30,0	8,8	28,7
9	0	0	16,0	52,4	13,3	43,4
10	0	0	16,2	52,8	13,3	43,4
11	0	0	15,9	51,9	13,26	43,3

No diagrama de superfície de resposta, obtidos para a interação entre temperatura e tempo para o planejamento em que o HCl foi utilizado como catalisador (Figura 29-a), observa-se uma tendência de maior produção de AL em temperaturas entre 160 e 175 °C e, em tempos de hidrólise, de 70 a 90 min. Acima de 175 °C e 100 min e abaixo de 160 °C e 70 min nota-se que a produção de AL decresce. Já, para o planejamento em que se utilizou H₂SO₄ (Figura 29-b), pode-se observar uma tendência para maior produção de AL em temperaturas e tempos menores que as da hidrólise feita com HCl, sendo que a temperatura com melhor resposta fica na faixa entre 155 e 170 °C, e em tempos de hidrólise entre 50 e 90 min. Acima de 170 °C e acima de 90 min, a produção de AL diminui.

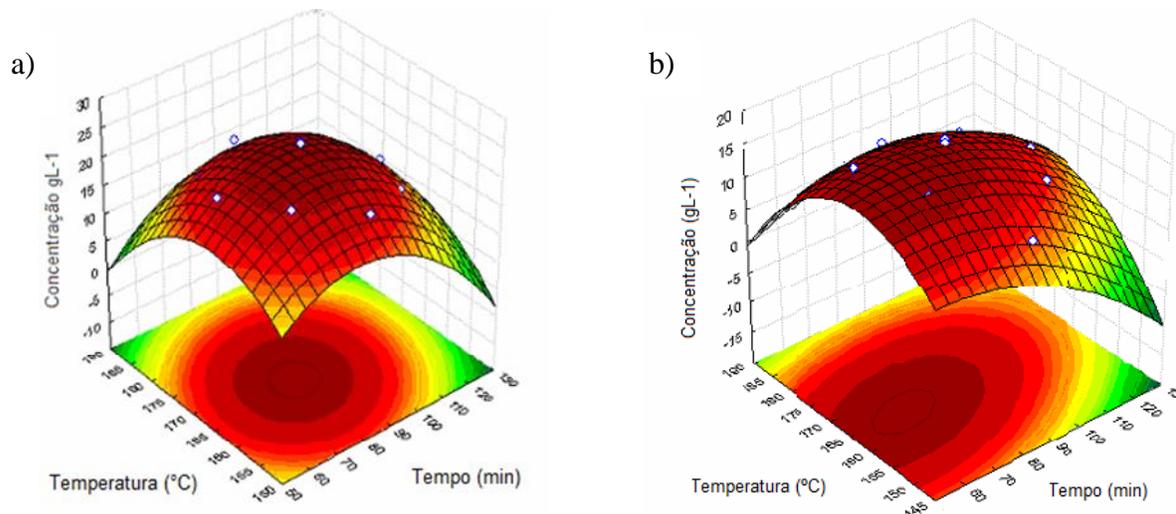


Figura 29-a) Superfície de resposta segundo modelo quadrático para a produção de AL a partir da hidrólise ácida da CA com HCl 4,5% (v/v). b) Superfície de resposta para o processo hidrolítico de produção de AL com H₂SO₄ 4% (v/v).

A Figura 30 mostra o diagrama de Pareto exibindo os efeitos das variáveis e, também, demonstrando como a eficiência do processo de produção de AL depende das variáveis tempo e temperatura para ambos os planejamentos. Tanto pelo modelo linear como pelo quadrático, com 95% de confiança.

Através dos diagramas de Pareto observa-se que a interação tempo e temperatura exerce maior efeito quando se utiliza HCl como agente hidrolítico uma vez que, o H₂SO₄ é um ácido mais forte e mais fixo que o HCl necessitando menor tempo reacional para degradar a celulose presente na casca.

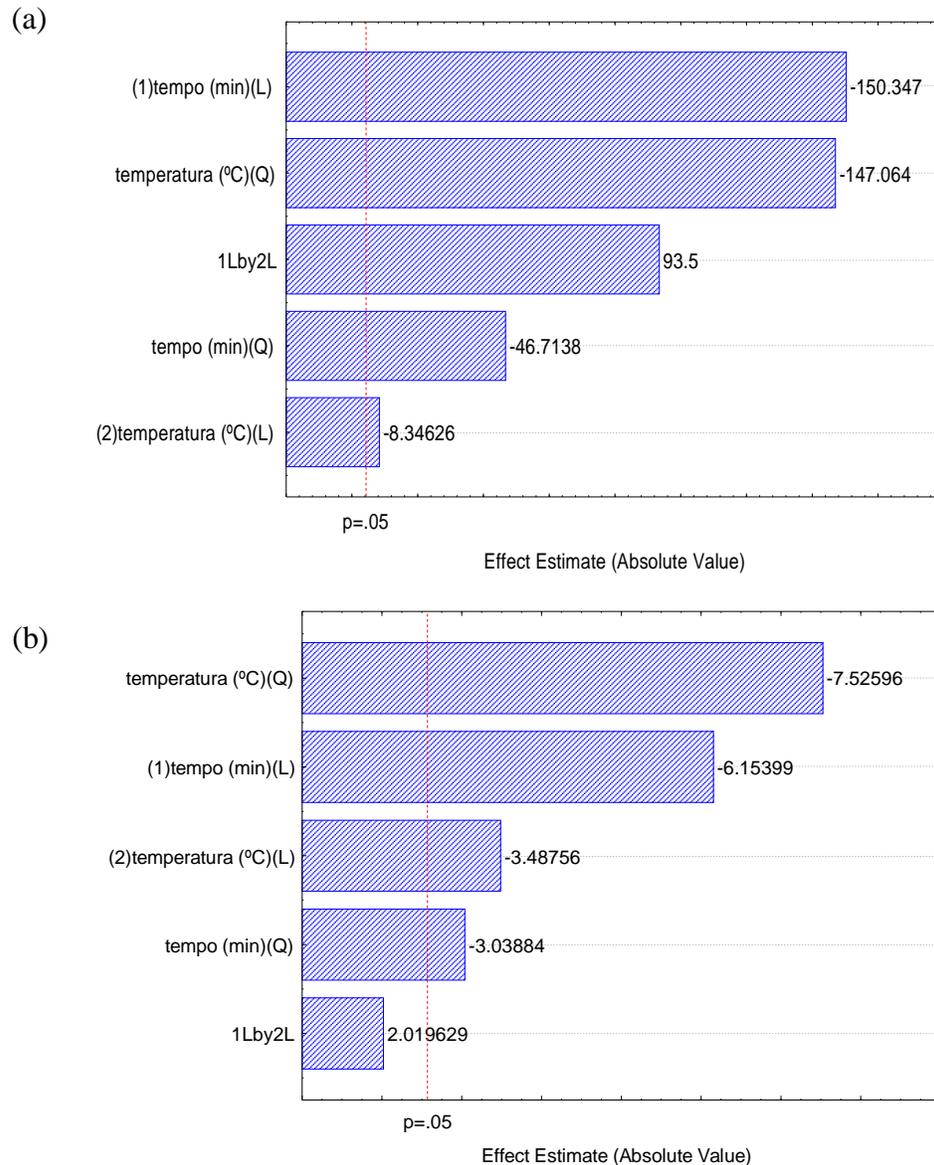


Figura 30- Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento CCD montado para o processo de produção de AL. a) Utilizando como catalisador HCl 4,5% (v/v). b) Utilizando como catalisador H₂SO₄ 4% (v/v).

Os parâmetros da ANOVA para o modelo quadrático foram utilizados na análise estatística (Tabela 11) de ambos os planejamentos. A verificação do modelo que melhor se ajusta aos resultados foi feita pela determinação do r^2 (coeficiente de determinação do modelo), calculado em 0,97 para o planejamento em que se fez a hidrólise com HCl, podendo-se dizer que 97% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. Já no planejamento em que se utilizou H₂SO₄, 96% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. A

significância estatística das variáveis foi calculada com o teste F (Fisher), comparando-se com o F calculado, que é a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo, com a distribuição F teórica (Dist. F), o que mostra que a regressão, neste caso, tem significância estatística, sendo $F_{\text{calc}} > \text{Dist. F}$, confirmando assim a relação entre as variáveis para ambos os planejamentos.

A equação de regressão resultante do planejamento de produção de AL a partir da hidrólise com HCl, para o modelo quadrático, está representado na equação 4.1.

$$\eta(\%) = -734,693 - 0,530A - 0,003A^2 + 9,240B - 0,029B^2 + 0,006AB \quad (4.1)$$

Já, para o planejamento com H₂SO₄, a equação de regressão resultante, para o modelo quadrático, está representado na equação 4.2.

$$\eta(\%) = -482,260 - 0,318A - 0,001A^2 + 6,002B - 0,018B^2 + 0,003AB \quad (4.2)$$

Tabela 11- Parâmetros ANOVA para o modelo quadrático do planejamento de superfície de reposta para o processo de produção do AL.

Catalisador ácido	Fonte de variação	SQ	nGL	MQ	F calc.	Dist. F
HCl 4,5% (v/v)	Regressão	1335952	5	267190,4	27,64	5,05
	Resíduo	48321	5	9664,2		
	Falta de Ajuste	47854	3	159513		
	Erro Puro	0,66	2	002333		
	Total	138.4273	10			
	$r^2 = 0,97$					
H ₂ SO ₄ 4,0% (v/v)	Regressão	3715792	5	743158,4	6,11	5,05
	Resíduo	154484	5	30896,8		
	Falta de Ajuste	154304	3	51434,6		
	Erro Puro	0,00180	2			
	Total	3870276	10			
	$r^2 = 0,96$					

(SQ = soma quadrática, nGL = número de graus de liberdade, MQ = média quadrática, Fcalc. = valor do teste F (Fisher) calculado, Dist. F = distribuição do teste F tabelado).

4.3.1 Influência da concentração do ácido na hidrólise

Várias concentrações de ácido clorídrico e sulfúrico foram testadas na hidrólise, a fim de se encontrar a condição que fornecesse o melhor resultado. Soluções de ácido sulfúrico nas concentrações de: 1, 2, 4, 6, 8% (v/v) e, também, soluções de diferentes concentrações de ácido clorídrico, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5% (v/v) foram testadas nas três melhores condições obtidas através da RSM (60 min e 170 °C, 70 min e 160 °C e 90 min e 170 °C), conforme se pode observar nos gráficos das Figuras 31 e 32 .

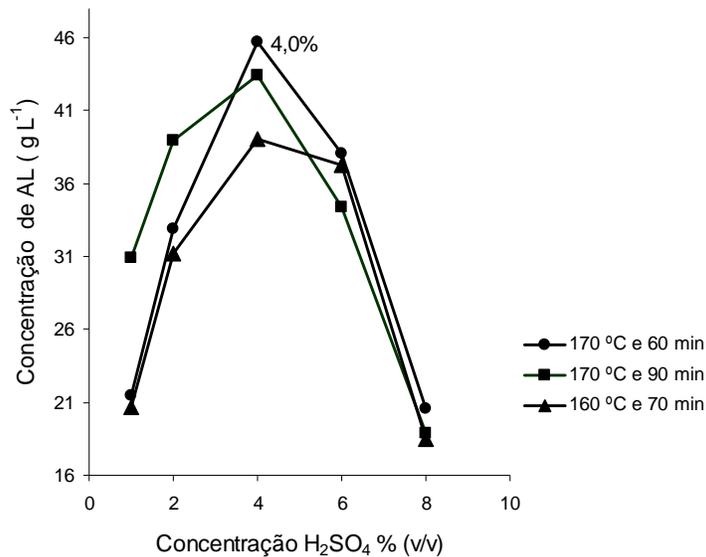


Figura 31- Efeito da concentração do ácido sulfúrico na produção de AL.

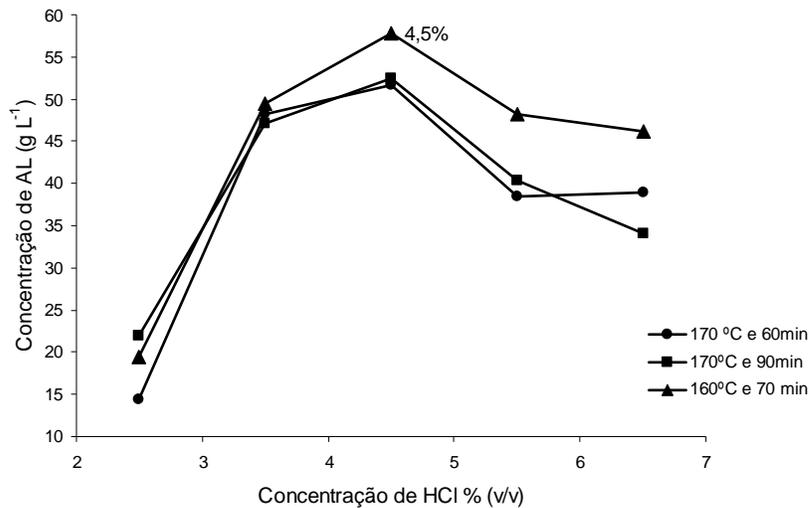


Figura 32- Efeito da concentração do ácido clorídrico na produção de AL

Analisando os gráficos gerados pela relação concentração do ácido versus concentração de AL produzido, pode-se concluir que a melhor condição reacional para produção de AL por hidrólise com HCl é em tempo e temperatura de 70 min e 160 °C, utilizando-se HCl 4,5% (v/v). Já na hidrólise da CA com H₂SO₄, a melhor condição foi em 60 min e 170 °C, utilizando-se H₂SO₄ 4% (v/v).

Comparando-se as condições otimizadas para os processos hidrolíticos, com HCl e H₂SO₄, pode-se observar que o HCl é um catalisador mais eficiente apesar do H₂SO₄ ser um ácido mais forte e fixo que este. Fato este, que se deve as condições reacionais de tempo e temperaturas mantidas até a formação do AL, fazendo com que o H₂SO₄ degrade parte da matéria orgânica devido o seu poder desidratante.

4.3.2 Influência do pré-tratamento da casca de arroz no rendimento de AL

A fim de se estabelecer a melhor condição para o processo hidrolítico, a CA foi submetida a vários pré-tratamentos, com vistas a avaliar-se o efeito destes sobre a composição química da biomassa e sua susceptibilidade à hidrólise ácida. Após submissão ao pré-tratamento, a biomassa

foi hidrolisada em condições reacionais já otimizadas [HCl 4,5% (v/v), 160 °C e 70 min]. No gráfico da Figura 33 expõe-se o efeito dos pré-tratamentos no rendimento de AL.

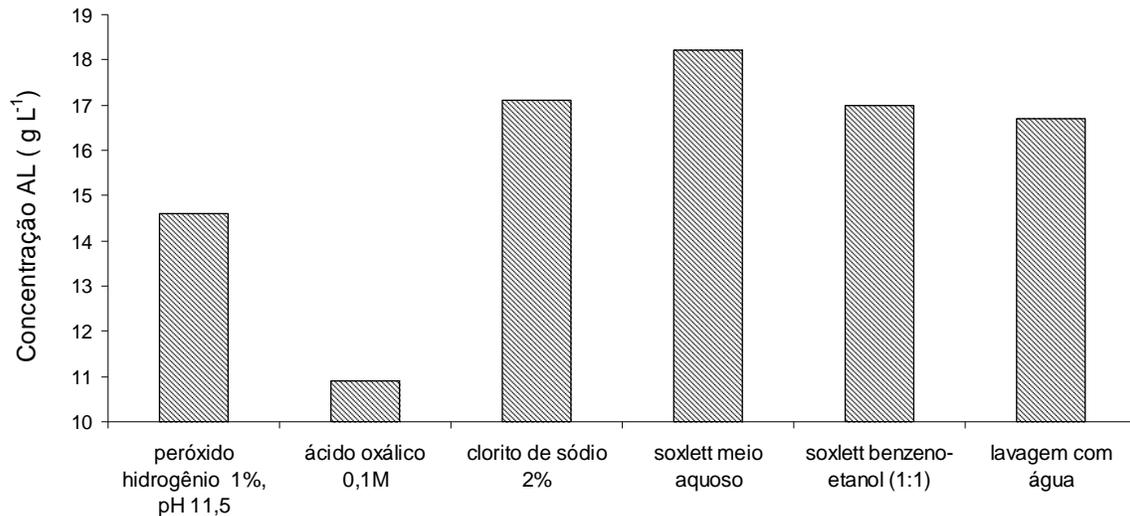


Figura 33- Efeito do pré-tratamento da biomassa no rendimento em AL.

Analisando-se o efeito dos pré-tratamentos utilizados pode-se concluir que a extração aquosa em soxhlet leva a um maior rendimento na produção de AL (18,2 g L⁻¹) devido à eliminação de alguns metais presentes na estrutura da CA, aumentando a susceptibilidade da biomassa à hidrólise ácida.

O pré-tratamento com ácido oxálico, que tinha a finalidade de eliminar por complexação os metais presentes na CA, semelhantemente ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em meio básico, que tinha por finalidade a deslignificação da biomassa, ambos não demonstraram vantagem para o processo de produção de AL. Fica evidente que parcela da glicose pode ser também liberada da celulose durante o tratamento.

A extração da CA com solvente orgânico em soxhlet e o pré-tratamento com clorito de sódio não influenciaram significativamente o rendimento em AL.

Foram determinadas as concentrações dos principais componentes dos hidrolisados da CA, *in natura* e com pré-tratamento, e os valores podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12- Composição do hidrolisado da CA em condição otimizada e com diferentes pré-tratamentos.

Pré- tratamento	Concentração AL (g L⁻¹)	Concentração 5-HMF (g L⁻¹)	Concentração glicose (g L⁻¹)
Catalisador HCl 4,5%, 160 °C, 70 min			
H ₂ O ₂ 1%	14,6	0,23	0,10
Clorito de sódio	17,1	0,15	0,12
Soxhlet meio orgânico	17,0	0,16	0,11
Soxhlet água	18,2	0,14	0,14
Ácido oxálico	10,9	0,26	0,09
Sem pré-tratamento	16,7	0,22	0,13
Catalisador H₂SO₄ 4%, 170 °C, 60 min			
H ₂ O ₂ 1%	13,9	0,25	0,09
Clorito de sódio	16,7	0,19	0,11
Soxhlet meio orgânico	16,0	0,17	0,09
Soxhlet água	17,2	0,15	0,10
Ácido oxálico	8,78	0,29	0,11
Sem pré-tratamento	14,0	0,21	0,12

Com o estudo feito sobre o processo hidrolítico de produção do AL em que se analisou o tipo e a concentração do ácido; o efeito do pré-tratamento da CA; o tempo, a temperatura e a pressão reacional foram definidas as condições ótimas de hidrólise. Quando a CA, previamente

extraída em meio aquoso por soxhlet, foi hidrolisada com HCl 4,5% (v/v) em temperatura de 160 °C, à pressão de 53 atm e tempo de hidrólise de 70 min obteve-se maior concentração de AL quando comparado com outras soluções hidrolíticas e outras condições reacionais. As condições reacionais otimizadas para o processo estão resumidas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições ótimas de hidrólise para a produção de AL a partir da CA.

Variável	Condição otimizada
Catalisador ácido	HCl
Concentração	4,5% (v/v)
Tempo	70 min
Temperatura	160 °C
Pressão	53 atm (calculada)
Pré-tratamento da biomassa	Extração por soxhlet em meio aquoso
Concentração obtida	18,2 g L ⁻¹
Rendimento teórico	59,4% (m/m)
Rendimento mássico	12,7% (m/m)

4.4 Balanço econômico aproximado

A CA praticamente não tem valor comercial, hoje em dia, mas, se aproveitada adequadamente pode representar fonte de renda e de geração de empregos.

O processo de produção do AL a partir da CA pode vir ser um processo viável economicamente. Para verificar-se isto, ainda que primariamente, fez-se um balanço econômico do processo, aproximado, considerando possíveis investimentos necessários e os rendimentos de produto, brutos. Neste balanço não se teve a preocupação com uma estreita aproximação à realidade industrial e à química da vida real, muito difíceis de serem estimadas.

O máximo valor encontrado para o rendimento mássico de AL foi de 12,7 g% (m/m). Como a hidrólise foi feita partindo-se de 1 g de CA e 10 mL de solução ácida, obtendo-se 7 mL de hidrolisado ao final do processo de hidrólise, pode-se estimar que partindo-se de 1

tonelada de CA pode-se produzir 127,4 Kg de AL. O valor comercial do AL com pureza > 98% pode chegar a US\$ 260,11/kg (valor de 1 US\$ = 1,78 R\$). (www.sigmaaldrich.com), portanto, de 1 tonelada de CA pode-se produzir AL com valor agregado de R\$ 58.986,20.

Ainda, como co-produto deste processo, tem-se o 5-HMF, numa concentração de 0,14 g L⁻¹ no hidrolisado produzido em condições otimizadas de produção de AL. Esta concentração corresponde a um rendimento mássico de 0,098% (m/m), podendo-se assim produzir 980 g de 5-HMF a partir de 1 tonelada de CA. O valor comercial do 5-HMF com pureza > 99% pode chegar a US\$ 15.674,15/kg (www.sigmaaldrich.com), e, portanto, a quantidade produzida de 5-HMF de 1 tonelada de CA pode ter um valor agregado de R\$ 27.340,00.

Descontando-se os gastos com os insumos necessários para o processo obtém-se, então, um balanço econômico aproximado, que pode ser observado na Tabela 14, em que se desconsidera uma série de outros fatores de custo. Por exemplo, em projetos de futuras termoelétricas à casca de arroz já se prevê custo de R\$ 5,00/t para esta matéria-prima. Assim sendo, este custo foi considerado. Entretanto, o gasto com energia, pela dificuldade de se produzir uma estimativa razoável, não foi considerado, especialmente, porque, se parte da matéria-prima CA for utilizada para gerar a energia necessária, este fator fica cancelado.

Tabela 14- Balanço econômico para a produção de AL e 5-HMF a partir de 1 tonelada de CA.

Parâmetros	Saída		Entrada	
	CA	HCl	AL	5-HMF
Concentração	-	4,5% (v/v)	18,2 g L ⁻¹	0,14 g L ⁻¹
Quantidades Processadas	1,00 t	450L (concentrado)	127,4 kg	980 g
Valores (R\$)	5,00	14.400,00	58.986,20	27.340,00

Saldo Total (Output-Input): R\$ 71.921,20

Verifica-se, desta maneira, que o processo investigado possui viabilidade econômica, em função do fato do saldo altamente positivo, ainda que tenha sido calculado de maneira aproximada, com os dados disponíveis e desconsiderando-se outros fatores de custo, tais como, investimento em equipamentos, manutenção, energia, mão-de-obra, transporte da biomassa até a indústria, purificação do hidrolisado e dos produtos finais, e outros custos operacionais.

4.5 Gerenciamento dos resíduos

No processo de produção de AL, é importante salientar que além dos resíduos sólidos gerados pela hidrólise ácida da CA, os quais são armazenados para aproveitamento em trabalhos futuros, a utilização de reagentes e solventes orgânicos no pré-tratamento da CA, e nas análises cromatográficas, acabam gerando resíduos. Os resíduos gerados no LATER são primeiramente segregados e após, encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da UFSM o qual entrega os resíduos a uma empresa especializada em tratamento de resíduos químicos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que é possível contribuir para a redução do acúmulo de resíduos de biomassa no meio ambiente - que, muitas vezes, têm se tornado fonte de poluição e de risco para a saúde humana e dos ecossistemas naturais - desde que sejam desenvolvidos processos adequados para seu reaproveitamento e utilização como matéria-prima.

Comparando as variáveis estudadas através do planejamento fatorial, observa-se que um maior rendimento de AL é obtido com a utilização de extração aquosa da CA em soxhlet, que possibilita um acréscimo de rendimento de 9% em relação ao tratamento de lavagem com água destilada. Também foi confirmado que a melhor solução hidrolítica para esta biomassa é o HCl a 4,5% (v/v). Da mesma forma, confirmou-se que a temperatura e o tempo reacional ótimos para a hidrólise com HCl a 4,5% (v/v) são 160 °C e 70 min, respectivamente. Em condições reacionais otimizadas, em que se obteve maior rendimento em AL, a concentração final de 5-HMF no hidrolisado foi inferior à obtida em condições não otimizadas, o que evidencia que em temperaturas mais elevadas (>160 °C) e tempos reacionais superiores a 70 min, a tendência à degradação do 5-HMF em AL é maior.

Também se observou que a etapa de pré-tratamento da biomassa não é uma etapa de grande influência positiva no processo. Este fato pode estar relacionado à severidade das condições reacionais (temperaturas e pressões mais altas e maiores tempos de reação), suficientes para degradar a celulose presente na matéria-prima, independente da etapa de pré-tratamento. Isto, do ponto de vista industrial-ambiental e econômico, pode ser interessante uma vez que reduz o tempo de processamento e o consumo de reagentes e insumos.

O método analítico desenvolvido e validado para a determinação de AL e 5-HMF nas amostras de hidrolisado por HPLC-UV, demonstrou boa sensibilidade e reprodutibilidade, como também, relativamente aos métodos mais comumente encontrados na literatura, rápido e eficiente, não necessitando de etapas morosas de *clean-up* das amostras.

Os valores dos rendimentos teóricos obtidos para o AL neste trabalho encontram-se na mesma faixa dos encontrados na literatura consultada, de 20 a 70%. Ainda, como co-produto deste processo tem-se o 5-HMF, para o qual foi determinada uma concentração média de 0,14 g L⁻¹ no hidrolisado produzido nas condições otimizadas para produção de AL. Obviamente, esta

concentração está abaixo dos valores citados na literatura, pois, os processos relatados de produção do 5-HMF são resultantes de rotas diferentes. No presente caso, o 5-HMF não é o produto de interesse principal e as condições reacionais não foram otimizadas para sua produção, sendo assim, um co-produto ou produto secundário, porém, não menos importante, industrialmente e quanto ao valor agregado.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o processamento da CA para a produção de AL demonstrou viabilidade técnica e econômica, em que há geração de produtos tecnológicos, com alto valor agregado, a partir do reaproveitamento de recurso renovável, rejeitado e causa de problemas ambientais na região sul-brasileira.

O processo de produção do AL (e 5-HMF) é constituído por experimento simples, pouco intensivo em energia, que utiliza reagentes simples e de custo reduzido. Do ponto de vista ambiental, reaproveitando resíduos da indústria arroseira para a produção de insumos farmoquímicos e petroquímicos, normalmente produzidos via síntese, a partir de derivados do petróleo.

6. PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS

- Utilização do hidrolisado de casca de arroz como meio de cultivo para produção de outros insumos químicos de alto valor agregado, como por exemplo, ácido succínico, ácido maléico, ácido láctico, ácido butírico, etanol e outros similares.
- Otimizar as variáveis do processo hidrolítico para maximizar a produção de 5-HMF e outros subprodutos da degradação da glicose.
- Aproveitar integralmente a CA através da utilização do resíduo da hidrólise ácida como matéria-prima para processos de conversão térmica (pirólise) para produção de bio-óleo, a partir do qual pode-se extrair vários insumos químicos.
- Aproveitar o resíduo hidrolítico para preparação de silicatos através da lixívia alcalina, uma vez que a casca de arroz é rica em SiO_2 .
- Extrair o AL e o 5-HMF do hidrolisado e purificar p.ex. por meio de métodos de cristalização fracionada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 julho de 2009.
- 2- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L. **Química Nova**, v.24, p.247-251, 2001.
- 3- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS), Economics and the International Year of Rice. Italy, 2004b. Disponível em: <<http://www.rice2004.org>>. Acesso em: 16 de novembro 2008.
- 4- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Produção Biotecnológica de Xilitol a Partir da Palha de Arroz. **Biociência & Desenvolvimento**, v.28, 2002, p.34-39.
- 5- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da economia mundial. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 de julho 2009.
- 6- AMATO, G.W.; CARVALHO, J.L.V.; SILVEIRA, F. S. **Arroz Parboilizado: tecnologia limpa, produto nobre**. Porto Alegre: Ricardo Lenz, 2002. p.240.
- 7- LUDWIG, V.S. **A agroindústria processadora de arroz: um estudo das principais características organizacionais e estratégicas das empresas líderes gaúchas**. Dissertação (Mestrado Em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- 8- AMICK, J.A. Purification of Rice Hulls as a Source of Solar Grade Silicon for Solar Cells. **Journal Electrochemistry Society**, v.129, 1982, p.864-866.
- 9- ARMESTO, L. et al. Combustion Behavior of Rice Husk in a Bubbling Fluidised Bed. **Biomass and Bioenergy**, v.23, 2002, p.171-179.
- 10- ZUCCO, L.L. **Estudo da viabilidade de fabricação de placas de compósitos à base de cimento e casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.
- 11- SUN, C. et al. Comparative Study of Hemicelluloses From Rice Straw by Alkali and Hydrogen Peroxide Treatments. **Carbohydrate Polymers**, v.42, 2000, p.111-122.
- 12- JACOBS, J.; KREUTZER, R.; SMITH, D. Rice Burning and Asthma Hospitalizations, Butte Country, California, 1983-1992. **Environmental Health Perspectives**, v.105, 1997, p.980-985.
- 13- SALEH, M.I.; ADAM, F. Adsorption isotherms of fatty acids on rice hull ash in a model system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.71, 1994, p.1363-1366.

-
- 14- ZHANG, M. H.; MALHORTA, V. M. High-performance concrete incorporating rice husk ash as a supplementary cementing material. **ACI Materials Journal**. v. 93, 1996, p.629-636.
- 15- ISHAK, Z.A.M.; BAKAR, A.A. An investigation on the potential of rice husk ash as fillers for epoxidized natural rubber (ENR). **European Polymer Journal**. v.3, 1995, p.259- 269.
- 16- FUAD, A. et al. Application of rice husk ash as fillers in polypropylene: Effect of titanate, zirconate and silane coupling agents. **European Polymer Journal**, v.31, 1995, p. 885.
- 17- FOLETTO, E. et al. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química nova**. v. 28, 2005, p.1055-1060.
- 18- HUSTON, D.F. Rice: Chemistry and Technology. **American Association of Cereal Chemists**, v. 70, 1972, p.301-352.
- 19- NAKATA, Y.; SUZUKI, M. Preparation and Properties of SiO₂ From Rice Hulls. **Journal Ceramic Society of Japan International**, v.97, 1989, p.830-836.
- 20- KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.13, 1993, p. 151-173.
- 21- ZANZI, R. **Pyrolysis of Biomass**. Dissertation (Master in Chemical Engineer)- Royal Institute of Technology, Stockholm, 2001.
- 22- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS), Rural and infrastructure, agro industries. Disponível em: < www.fao.org/docrep/T4470E/4470eOa.htm>. Acesso em: 14 julho de 2009.
- 23- ISMAIL, M.S; WALLIUDDIN, A.M. Effect of rice husk ash on high strength concrete. **Construction and Building Materials**. v.10, 1996, p.521–526.
- 24- CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S. **Tecnologia de conversão energética da biomassa**. Série sistemas energéticos, V. II, EDUA/EFEL, Manaus, 1997.
- 25- MARTÍNEZ, J. et al. Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado. **Química Nova**. v. 32, 2009, p. 1110-1114.
- 26- MORAIS, M. R. **Preparação de sílica organofuncionalizada a partir de casca de arroz, com capacidade adsorvente de íons metálicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) -Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

-
- 27- MURPHY, J.D.; MCCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy**, v. 82, 2005, p. 148-166.
- 28- SHEBANI, A. et al. The effect of wood extractives on the thermal stability of different wood species. **Thermochemica Acta**, v.471, 2008, p.43-50.
- 29- RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, 2003, p. 863-871.
- 30- MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.23, 2001, p.1681-1684.
- 31- AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. **Bioresource Technology**. v. 79, 2001, p. 277-299.
- 32- EFFENDI, A.; GERHAUSER, H.; BRIDGWATER, A.V. Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: A review. **Renew Sustain Energy Reviews**, v.12, 2008, p. 2092-2116.
- 33- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, 2003, p. 863-861.
- 34- D'ALMEIDA, M. L.O. **Composição química de materiais lignocelulósicos**. Celulose e papel – Tecnologia de fabricação da pasta celulósica. São Paulo: Escola SENAI. v.2, 1998, p.26.
- 35- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v.24, 2001, p.247-251.
- 36- WENZEL, H. F. **The Chemical Technology of Wood**. London :Academic Press, 1970, p.101-139.
- 37- CHANG, V. S., HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, 200, p.5-37.
- 38- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, 2000, p.69-80.
- 39- HSU, T.A., LADISCH, M.R., TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v.10, 1980, p.315-319.
- 40- FAN, L. T., LEE, Y. H.; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.23, 1982, p.157-187.

-
- 41- SUN, C. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, 2004, p.195–204.
- 42- REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURAN, N.; Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos Químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v.21, 1998, p. 140-143.
- 43- LEE, J.W.; RODRIGUES, R.C.L.B; JEFFRIES, T.W. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. **Bioresource Technology** , v.100, 2009, p.6307–6311.
- 44- BAUDEL, H.M. **Pré-tratamento e hidrólise**. III workshop tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, 2006.
- 45- SZENGYEL, Z. **Ethanol form wood cellulose enzyme production**. Thesis (PhD Chemical Engineering)- Lund University, Lund, 2000.
- 46- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, 2002, p.1-11.
- 47- GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74, 2006, p.78-88.
- 48- AGUILAR, R. et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.5, 2002, p.309-318.
- 49- HORVAT, J. et al. Mechanism of levulinic acid formation. **Tetrahedron Letters**. V.26, 1985, p. 2111-2114.
- 50- TIMOKHIN, B.V.; BARANSKY, V.A.; ELISEEVA, G.D. Levulinic Acid in Organic Synthesis. **Russian Chemical Reviews**. v.68, 1999, p.73-84.
- 51- BOZELL, J. et al. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. **Resources, Conservation and Recycling**, v.28, 2000, p. 227–239.
- 52- PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY: Conversion of Levulinic Acid to Methyl Tetrahydrofuran. Disponível em: <<http://availabletechnologies.pnl.gov>>. Acessada em: 14 setembro de 2009.
- 53- CENTRE FOR PHOTOBIOLOGY AND PHOTODYNAMIC THERAPY. Disponível em: <<http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt>>. Acessada em: 15 abril de 2008.

-
- 54- FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Disponível em: < <http://www.fda.gov/cder>>. Acessada em: 15 abril de 2008.
- 55- DUSA PHARMACEUTICS COMPANY. Disponível em: < <http://www.dusapharma.com>>, acessada em 15 abril de 2008.
- 56- SILVA, J. **História dos Benzodiazepínicos**. In: Bernik MA, coordenadores. *Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência*. São Paulo: Edusp.1999, p.15-28.
- 57- FARNLEITNER, L. et al. **Preparation of stable levulinic acid**. German patent 3920340, 1991.
- 58- ITAYA, H.; SHIOTANI, A.; TORIYAHARA, Y. **Preparation of levulinic acid from furfuryl alcohol**. Japanese patent 62252742, 1998.
- 59- EDWARDS, W.B. **Preparation of oxycarboxylic acids**. US patent 4612391, 1986.
- 60- VAERMAN, J.M.; BERTRAND, J.N.M. **Selective oxidation of ketones**. German patent 2125162 , 1972.
- 61- CAVINATO, G.; TONIOLO, L. Levulinic acid synthesis via regiospecific carbonylation of methyl vinyl ketone or of its reaction products with hydrochloric acid or an alkanol or of a mixture of acetone with a formaldehyde precursor catalyzed by a highly active palladium-hydrochloric acid. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** , v.58, 1990, p.251–67.
- 62- BALLINI, R.; PETRINI, M. Facile and inexpensive synthesis of 4-oxoalkanoic acids from primary nitroalkanes and acrolein. **Synthesis**, 1986, p.1024–1026.
- 63- HARRIS, J.F. Acid hydrolysis and dehydration reactions for utilizing plant carbohydrates. **Applied Polymer Symposium**, v.28, 1975, p.131–144.
- 64- SHA, P.T.; MA, S.Y.; Levulinic acid and its esters. **Journal of the American Chemistry Society**, v.52, 1930, p.4880–4883.
- 65- THOMAS, R.W.; SCHUTTE, A.H. Studies on levulinic acid. I. Its preparation from carbohydrates by digestion with hydrochloric acid under pressure. **Journal of the American Chemistry Society**, v.53, 1931, p.2324–2328.
- 66- THOMPSON, A. **Method of making levulinic acid**. US Patent No. 2206311,1940.
- 67- WIGGINS, W.F. Utilization of sucrose. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**. v.4,1949, p.306–314.

-
- 68- FITZPATRECK, S.W. **Production of levulinic acid from carbohydrate containing materials**. US Patent 5608105, 1995.
- 69- FANG, Q.; HANNA, M.A. Experimental studies for levulinic acid production from whole kernel grain sorghum. **Bioresource Technology**, v.81, 2002, p.187-192.
- 70- CHA, J.Y.; HANNA, M.A.; Levulinic acid production based on extrusion and pressurized batch reaction. **Industrial Crops and Products**, v.16, 2002, p.109–118.
- 71- CHANG, C.; CEN, P.; MA, X. Levulinic acid production from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.98, 2007, p.1448-1453.
- 72- YAN, L. et al. Production of Levulinic Acid from Bagasse and Paddy Straw by Liquefaction in the Presence of Hydrochloride Acid. **Clean**, v.36, 2007, p.158 -163.
- 73- HUBER, G.W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. **Chemical Review**. v. 106, 2006, p. 4044-4098.
- 74- ROMAN-LESHKOV, Y. et al. Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. **Nature**, v.447, 2007, p. 982–986.
- 75- ROMÁN-LESHKOV, Y. et al. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. **Science**, v. 312, 2006, p. 1933–1937.
- 76- ZHAO, H. et al. Metal Chlorides in Ionic Liquid Solvents Convert Sugars to 5-Hydroxymethylfurfural. **Science**, v.316, 2007, p.1597–1600.
- 77- SU, Y. et al. Single-step conversion of cellulose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF), a versatile platform chemical, **Applied Catalysis A: General**, v.361, 2009, p.117–122.
- 78- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, E.D. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. São Paulo: Unicamp, 2003, p.201-285.
- 79- FERREIRA, S. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v.1158, 2007, p. 2-14.
- 80- MAHAN, H.B. **Química: Um curso universitário**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1972.

-
- 81- SHU, C.H., YANG, S.T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, 1990, p.454-468.
- 82- QUIBASA (QUIMICA BÁSICA LTDA). Disponível em: <<http://www.bioclin.com.br/iuso/glicosemono.pdf>>. Acessada em: 16 julho 2009.
- 83- RODRÍGUEZ-BERNALDO, Q.A.; LAGE-YUSTY, M.A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. Comparison of two stationary phases for the separation of five selected polyphenols. **Talanta**, v.77, 2008, p.98–102.
- 84- SANO, A. et al. Determination of levulinic acid in soy sauce by liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v.105, 2007, p.1242–1247.
- 85- CARDOSO, A.L. **Biorrefinaria: Investigação de Processos Físico-Químico, Fermentativo e Térmico de Aproveitamento de Serragem de Eucalipto**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- 86- WILLIAMS, P.T.; NUGRANAD, N. Comparison of products from the pyrolysis and catalytic pyrolysis of rice husks. **Energy**, v.25, p.493–513, 2000.
- 87- INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.