

UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL –
MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA A ENGENHARIA
AMBIENTAL E SANITÁRIA

Célio Seidel Junior

APROVEITAMENTO DE GRÃOS NÃO NOBRES DE ARROZ PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL

Santa Cruz do Sul
2016

Célio Seidel Junior

**APROVEITAMENTO DE GRÃOS NÃO NOBRES DE ARROZ PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Microbiologia Aplicada a Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Santa Cruz do Sul

2016

Célio Seidel Junior

**APROVEITAMENTO DE GRÃOS NÃO NOBRES DE ARROZ PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado, Área de Concentração em Microbiologia Aplicada a Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider
Professora Orientadora – UNISC

Dra. Maria Silvana Aranda Moraes
Professora Examinadora – UFRGS

Dra. Michele Hoeltz
Professora Examinadora – UNISC

Santa Cruz do Sul
2016

Ao Movimento dos Pequenos Agricultores - MPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA, demandante e financiador deste projeto. Instituição que, sensível às questões importantes do Estado do Rio Grande do Sul, abriu o diálogo que resultou na realização deste Trabalho.

Agradeço à Cooperativa Mista dos Fumicultores do Brasil Ltda– Cooperfumos que imediatamente aceitou o desafio proposto pelo IRGA e confiou a mim a tarefa de executar o trabalho. A confiança da Cooperativa na minha pessoa é motivo de grande gratidão. A Cooperfumos se notabiliza por construir junto aos seus associados, em sua maioria pequenos agricultores produtores de fumo, alternativas à diversificação agrícola, sempre atenta ao cuidado e respeito com a natureza, valorizando a figura do homem do campo, enquanto protagonista na sociedade brasileira. É motivo de grande orgulho para mim fazer parte desta trajetória.

Agradeço a Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC por topar junto este desafio. Um agradecimento especial à todas as pessoas que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, que acolheu o projeto de forma tão dedicada.

Agradeço a Professora Rosana Schneider, orientadora deste projeto, pelo empenho, colaboração, conhecimento, amizade e gentileza incondicional não somente ao trabalho em si, mas também no cuidado às pessoas, para quem agradeço de coração, profissionalmente e pessoalmente. Muito obrigado!

Agradeço a Francesca Fornasier pela dedicação, disponibilidade e profissionalismo no apoio a toda parte prática deste projeto, representando uma figura fundamental.

Agradeço, muito pessoalmente, a todo povo do Movimento dos Pequenos Agricultores - MPA que faz a luta por justiça e por uma vida melhor para todos e todas diariamente, incansavelmente.

Por fim e, mais importante, agradeço a todos familiares e amigos mais próximos pelo apoio que dedicaram a minha pessoa durante este período. De coração, meu muito obrigado a todos!

*O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

Para que(m) serve o teu conhecimento?

Autor desconhecido

RESUMO

A energia produzida a partir da biomassa representa uma oportunidade não somente de minimizar o efeito estufa, mas também de reduzir a dependência do petróleo, diversificando a matriz energética. O presente trabalho avalia a produção de etanol utilizando grãos não nobres de arroz, do tipo de 3 e 4. Para isso, determinou-se a concentração de amido nas amostras de grãos. Posteriormente, o arroz foi triturado, cozido e hidrolisado enzimaticamente, seguido do processo de fermentação. Durante o processo enzimático testado, utilizou-se, tanto em meio tamponado e aquoso, as enzimas comerciais Liquozyme Supra 2.2X e AMG 300L para a hidrólise e a levedura Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast para a fermentação, segundo orientações dos fabricantes. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras analisadas indicaram uma média de 80,14% de concentração de amido. Desse valor, 70% da concentração de amido sofreu conversão para glicose, através da hidrólise. Por fim, durante a etapa de fermentação obteve-se a produção de 14,61% de etanol. Dessa forma, os resultados se mostraram satisfatórios, já que estão dentro do esperado e de acordo com o alcançado por outros pesquisadores.

Palavras chave: Etanol, arroz não nobre, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The energy produced from biomass represents an opportunity not only to minimize the greenhouse effect, but also to reduce dependence on oil, diversifying the energy matrix. The present study evaluates the production of ethanol using non-noble rice grain, type 3 and 4. For this, it was determined the concentration of starch in grain samples. Posteriorly, the rice was milled, cooked and enzymatically hydrolyzed, followed by a fermentation process. During the enzymatic process tested, was used in both aqueous and buffered medium, commercial enzymes Liquozyme Supra 2.2X and AMG 300L for the hydrolysis, and Angel Yeast Yeast Alcohol Resistance Thermal for fermentation, according to the manufacturer's guidelines. The samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The samples analyzed showed an average of 80.14% of starch concentration. Of this amount, 70% of the starch concentration underwent conversion to glucose by hydrolysis. Finally, during the fermentation stage was obtained the production of 14.61% of ethanol. So, the results were satisfactory, as they are within the expected and in accordance with reached by other researchers.

Key words: Ethanol, rice there noble, hydrolysis enzymatic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um corte de um grão de arroz e suas partes. Fonte: adaptado de (Ufrgs).	17
Figura 2. Ilustração de uma molécula de glicose em destaque. Fonte: adaptado de (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).....	19
Figura 3. Tipos de ligações entre moléculas de glicose para formação de maltose e amido. Fonte: adaptado de (Surmely <i>et al.</i> , 2001).	21
Figura 4. Sequência resumida de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Fonte: adaptado de (Lima, Basso e Amorim, 2001).....	26
Figura 5. Fluxograma da metodologia para quantificação de amido.	31
Figura 6. Resultado do teste em Série Tyler para granulometria.	34
Figura 7. Relação dos compostos formados para a hidrólise com a liquozyme em meio tamponado.....	38
Figura 8. Relação dos compostos formados para a hidrólise com a liquozyme + AMG em meio tamponado.....	38
Figura 9. Conversão (%) do amido presente na biomassa em glicose, empregando as enzimas Liquozyme e AMG em sequência.....	39
Figura 10. Relação entre o conteúdo de glicose e maltose ao longo da hidrólise empregando as enzimas Liquozyme e AMG em sequência.	40
Figura 11. Fermentação do hidrolisado dos grãos de arroz não nobres obtidos empregando a levedura Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast.....	42
Figura 12. Representação gráfica do comportamento dos açúcares e da produção de etanol durante a fermentação.....	43
Figura 13. Fluxograma com os rendimentos finais.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido. Fonte: adaptado de (Storck, 2004).....	17
Tabela 2. Médias das conversões em açúcares totais obtidas pela hidrólise com a enzima Liquozyme.	35
Tabela 3. Conversão em Glicose do arroz moído com relação à biomassa pesada inicialmente para as duas enzimas utilizadas em sequência.	36

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Fundamentação teórica.....	15
2.1	Etanol de arroz.....	15
2.2	Caracterização dos grãos de arroz	16
2.3	Hidrólise/sacarificação	19
2.3.1	Caracterização do amido.....	19
2.4	Comportamento térmico.....	21
2.4.1	Decomposição	21
2.4.2	Gelatinização	21
2.4.3	Hidrólise enzimática.....	22
2.5	Fermentação	23
2.5.1	Tipos de processo	23
2.5.2	Agente fermentativo.....	24
2.5.3	Reações envolvidas.....	25
2.5.4	Fatores intervenientes	27
2.6	Estado da arte.....	28
3	Metodologia.....	30
3.1	Matéria-prima	30
3.1.1	Granulometria.....	30
3.1.2	Quantificação do amido	31
3.2	Determinação dos açúcares e etanol	32
3.3	Hidrólise/sacarificação	32
3.4	Fermentação	33
4	Resultados e discussões.....	34
4.1	Granulometria	34

4.2	Quantificação do amido.....	34
4.3	Hidrólise/sacarificação e fermentação.....	35
4.3.1	Hidrólise em meio tamponado	35
4.3.2	Hidrólise em meio com pH ajustado com solução ácida.....	39
4.4	Fermentação	42
5	considerações finais.....	45
6	Referências bibliográficas	46

1 INTRODUÇÃO

A bioenergia, ou seja, energia produzida a partir da biomassa, representa uma oportunidade não somente de minimizar o efeito estufa mas também de reduzir a dependência do petróleo, diversificando a matriz energética (United Nations Organization for Food and Agriculture, 2008).

No Brasil, desde o ano de 1931, através do decreto nº 19.717 (Brasil, 20 de fevereiro de 1931), nosso país institucionalizou a utilização de etanol combustível no território nacional, impondo aos importadores de gasolina a aquisição de 5% do volume importado. Em 1966 o decreto nº 59.190 (Brasil, 8 de Setembro de 1966) passou a prever a adição do etanol na gasolina, no máximo 25%, possibilitando que o mercado produtor se desenvolvesse. Mas foi com o Proálcool , em 1975, que o etanol passou a ganhar a atenção merecida no Brasil.

O Proálcool objetivava aumentar a produção de safras agroenergéticas e a capacidade industrial de transformação, para obtenção de álcool em substituição ao petróleo e seus derivados, em especial a gasolina. Segundo seu próprio idealizador, Bautista Vidal (Vasconcelos e Vidal, 1998), este programa permitiria ao Brasil adentrar em uma nova era, onde assumiria um papel de protagonista no cenário energético mundial, quiçá, de maior potência do setor, garantindo sua soberania e melhorias sociais nunca antes experimentadas no país.

Criado em 1975, o Proálcool garantiu, em primeira instância, uma porcentagem mínima de álcool na gasolina e mais tarde, em 1979, instituiu os veículos movidos 100% a álcool. Sua derrocada, atribuída por uma supervalorização do açúcar no mercado mundial e como consequência o abandono dos usineiros ao abastecimento do combustível no mercado interno, é rebatida pelo autor que afirma que o corte no financiamento das lavouras de matéria-prima de pequeno e médio portes, somado às investidas de grupos econômicos internacionais interessados no mercado e no protagonismo brasileiro no ramo energético, inviabilizaram e desconstruíram a legitimidade do programa junto aos brasileiros.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012), os estados produtores de etanol destacam-se também por serem os maiores consumidores deste combustível. Exemplo disso, é que o estado de São Paulo representa o maior produtor nacional e também o maior demandante, com 60% do consumo total. O Rio Grande do Sul, apesar de possuir a quinta maior frota estadual

de veículos do país (Denatran), é, juntamente a outros estados, o que menos consome o combustível. Em 2011, o RS produziu apenas 2 mil metros cúbicos anuais de etanol (Maistro, 2011), sendo fortemente dependente da importação do combustível, especialmente advindo de São Paulo, comprometendo a sua competitividade frente à gasolina, já que os custos de frete e as alíquotas de ICMS encarecem o produto para no mercado gaúcho.

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer polissacarídeo que contenha açúcares ou amidos, mesmo que estruturados em moléculas maiores. Materiais amiláceos, como a mandioca, batata-doce, milho e arroz podem ser matérias-primas para produzir etanol. Materiais celulósicos também podem ser utilizados para a produção de álcool. Nestes dois casos, é necessário um pré-tratamento para sacarificar a matéria-prima para somente então, ela ser fermentada. Matérias-primas açucaradas, como é o caso da cana de açúcar, comumente utilizada para a finalidade de produção de álcool, representam a biomassa mais largamente utilizada para a produção de etanol (Cgee, 2008).

No que diz respeito a cultura do arroz, a produção anual é de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com 13.140.900t (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não-asiático entre os 10 maiores produtores (Fao, 2015). Desta quantidade, apenas uma pequena parcela de arroz é consumida como ingrediente em produtos processados, sendo seu maior consumo na forma de grão. O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, o qual pode ser utilizado para produção de etanol. No Brasil, o consumo per capita em 2002 foi de 108g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (Kennedy, 2002).

O clima inadequado para cultivar a cana-de-açúcar tem sido determinante para que o Rio Grande do Sul deixe de figurar no mapa da produção de etanol, e importe de outros Estados grande parte do combustível. Praticamente todo o etanol consumido no Rio Grande do Sul é fornecido por outros estados. Isso ocorre porque as condições edafoclimáticas da região não sejam propícias para o bom desenvolvimento da cana-de-açúcar (Anp, 2015).

Por outro lado, a região sul responde por cerca de 80% da produção brasileira de arroz, sendo o estado gaúcho, o maior produtor nacional, com mais de 65% do grão colhido, onde a produtividade média do arroz irrigado está em 7.500 kg por hectare, bem acima da média brasileira, que é de 4.500 kg (Irga, 2015).

Algumas iniciativas vindo sendo tomadas para a utilização de arroz com fins energéticos. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa vem desenvolvendo uma linhagem de arroz que tem o dobro do tamanho dos grãos convencionalmente usados na alimentação humana. O chamado arroz gigante não atende aos padrões da indústria e do consumidor brasileiro. No entanto, este pode ser ótimo para a produção de álcool e para a alimentação animal. A produtividade é superior a 12 toneladas por hectare, o que é quase o dobro das cultivares tradicionais, que ficam entre 7,5 toneladas. Além de ser bastante produtiva, ela apresenta qualidades agrônômicas como a rusticidade e a boa adaptação às áreas rizícolas do Rio Grande do Sul (Embrapa, 2015).

No que se refere à produção de etanol, no RS a produção é ainda incipiente, por conta de que há uma indústria instalada no RS: a Coopercana, em Porto Xavier e um projeto para a instalação de outras unidades produtivas distribuídas pelo território gaúcho. A sua produção em escala comercial está em torno de 7 milhões de litros/ano, o que representa apenas 5 a 6% do consumo do estado (Irga, 2015).

Desta forma, o presente trabalho se propõe a analisar uma alternativa para a produção de etanol combustível no Estado do Rio Grande do Sul a partir de resíduos do sistema produtivo do arroz, especialmente aqueles não nobres, que não são destinados ao consumo humano.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Etanol de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial (Walter, Marchezan e Avila, 2008; Storck, Silva e Comarella, 2009). A produção mundial anual de arroz é de aproximadamente 606 milhões de toneladas (Fao, 2015).

O arroz é consumido no Brasil, principalmente, na forma de grãos inteiros, descascados e polidos, ao contrário do que ocorre com o trigo e o milho que são transformados em outros produtos antes do consumo (Castro *et al.*, 1999). O desenvolvimento de produtos mais sofisticados utilizando o arroz como matéria-prima seria incompatível com o poder de compra da maioria da população mundial tradicionalmente consumidora de arroz (Nabeshima e El-Dash, 2004). Entretanto, o aproveitamento de seu subproduto torna-se viável, pois, durante o beneficiamento do arroz, resultam aproximadamente 14% de grãos quebrados (Castro *et al.*, 1999), que apresentam menor valor comercial. Uma das alternativas para agregar valor aos grãos quebrados seria a produção de etanol utilizando esses resíduos.

O etanol produzido a partir do arroz é uma alternativa à produção do álcool no Estado do Rio Grande do Sul e representa também uma nova via para aproveitamento do arroz não consumido como alimento, que são os grãos quebrados, de tipo 3 e tipo 4. A base para a produção do etanol no Rio Grande do Sul pode ser o amido de arroz Desclassificado para Consumo Humano – DCH (Irga, 2015).

Avalia-se ainda que o aproveitamento de parte da produção do arroz para o etanol diminuirá o acúmulo de estoque e poderá aumentar o preço do produto, beneficiando o agricultor. Consumindo 500 mil toneladas por ano, seria já é o suficiente para alterar o cenário estrutural do mercado. Desta forma, o etanol pode representar um acréscimo positivo ao mercado do arroz, gerando alternativas que agreguem valor ao subproduto (Irga, 2015).

O rendimento do arroz para produção de etanol pode se equivaler ao rendimento da cana de açúcar, e é superior a do sorgo e do trigo (Irga, 2015).

A empresa Vinema Biorefinarias do Sul, tem investido no Estado do Rio Grande do Sul com proposta para produzir etanol em grande escala a partir de

cereais, sendo pioneira no país. A proposta visa instalar seis unidades de produção de etanol, as quais, cada uma, estão estrategicamente localizadas em diferentes regiões do Rio Grande do Sul, conforme distribuição do IRGA (Irga, 2015).

2.2 Caracterização dos grãos de arroz

O grão de arroz consiste da cariopse e de uma camada protetora, a casca (Figura 1). A casca, composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, corresponde a cerca de 20% do peso do grão. A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam entre 5 e 8% da massa do arroz integral. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos proteicos) e os corpos lipídicos. O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídios, e representa entre 2 e 3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (entre 89 e 94% do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos proteicos (Juliano e Bechtel, 1985).

Através da descascagem, separa-se a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral. Este pode ser polido para remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa entre 8,5 e 14,8% do arroz integral (Juliano e Bechtel, 1985), obtendo-se o arroz branco polido. Os grãos também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico através do qual se obtém o arroz parboilizado, o qual pode ser consumido na forma integral ou polido. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. Dessa forma, o polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral e o polido (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

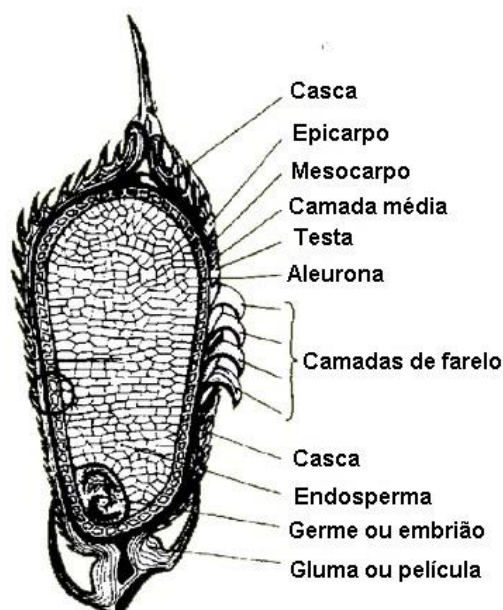


Figura 1. Ilustração de um corte de um grão de arroz e suas partes. Fonte: adaptado de (Ufrgs).

O processamento influencia o percentual de amido, proporcionalmente, sendo este maior no arroz branco polido (87,58%) e no parboilizado polido (85,08%) comparado ao integral (74,12%) (Tabela 1), devido à remoção do farelo (Goddard, 1984).

Tabela 1. Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido. Fonte: adaptado de (Storck, 2004).

Constituinte	Arroz integral	Arroz branco parboilizado	Arroz parboilizado polido
Amido Total (%)	74,12	87,58	85,08
Proteínas (N x 5,95) (%)	10,46	8,94	9,44
Lipídios (%)	2,52	0,36	0,69
Cinzas (%)	1,15	0,30	0,67
Fibra total (%)	11,76	2,87	4,15

O arroz apresenta pequena quantidade de açúcares livres, localizados principalmente nas camadas externas do grão, sendo sua concentração afetada pela variedade, grau de polimento e processamento. Os principais açúcares no arroz são sacarose (aproximadamente 90%), glicose e frutose (Matsuo, 1995). Segundo Tran (2004), o arroz integral contém 685 mg por 100 g de sacarose e 40 mg por 100 g de glicose, ocorrendo redução significativa nos teores após o polimento, com valores de

142 e 20 mg por 100 g para sacarose e glicose, respectivamente (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

Além dos aminoácidos proteicos, o arroz também apresenta pequena quantidade de aminoácidos livres, localizados principalmente no gérmen (594,9 mg por 100 g) e no farelo (361,4 mg por 100 g), com pequena concentração no endosperma (52,7 mg por 100 g). Entre os aminoácidos livres, predominam o aspartato e o glutamato, que correspondem a aproximadamente 60% do total (Saikusa, 1994).

Os lipídios podem ser encontrados na camada de aleurona, no embrião e no endosperma, ou associados a grânulos de amido (Lumen e Chow, 1995). Entretanto, a maior concentração ocorre no gérmen (1/3 do conteúdo total) e na camada de aleurona. Dessa forma, a concentração de lipídios é maior no arroz integral, sendo reduzida com o polimento, geralmente observando-se concentrações inferiores a 1% no arroz polido (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

Quanto aos minerais existentes nos grãos de arroz, tanto o integral e o polido, destacam-se fósforo, potássio e magnésio. Ferro e zinco estão disponíveis em baixas concentrações no grão (Juliano e Bechtel, 1985). De forma geral, os minerais apresentam-se em maior concentração nas camadas externas do grão com aproximadamente 72% no farelo e 28% no grão polido (Itani, 2002).

Com a parboilização, observa-se aumento no conteúdo mineral comparado ao arroz branco polido (Tabela 1), relacionado à migração de minerais das camadas externas para o endosperma durante o processo (Juliano, 1993). Entretanto, avaliando-se individualmente os minerais, são observados comportamentos diferenciados. Há relatos de maiores concentrações de potássio e fósforo no arroz parboilizado polido comparado ao branco polido, sem efeito na concentração de magnésio (Storck, 2004; Heinemann, 2005). Por outro lado, as concentrações de manganês, zinco e sódio são menores, indicando que os minerais apresentam diferentes padrões de migração durante a parboilização, afetando diferentemente sua concentração nos grãos (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

2.3 Hidrólise/sacarificação

2.3.1 Caracterização do amido

O amido é um polissacarídeo constituído de cadeias retas e ramificadas onde cada molécula é formada de várias centenas de unidades de glicose ligadas entre si. O amido é um hidrato de carbono, além de hidrogênio e oxigênio na proporção de 6:10:5 de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. As unidades de glicose estão ligadas entre si pelo carbono 1 (C1) e o carbono 4 (C4) através de oxigênio, através de uma ligação do tipo glicosídica. O amido é composto principalmente de amilose e amilopectina, sendo a primeira um polímero linear constituído por aproximadamente 6.000 unidades de glicose, conectadas por ligações $\alpha(1,4)$ (Whistler e Daniel, 1984). A fórmula estrutural de uma molécula de glicose pode ser vista na Figura 2.

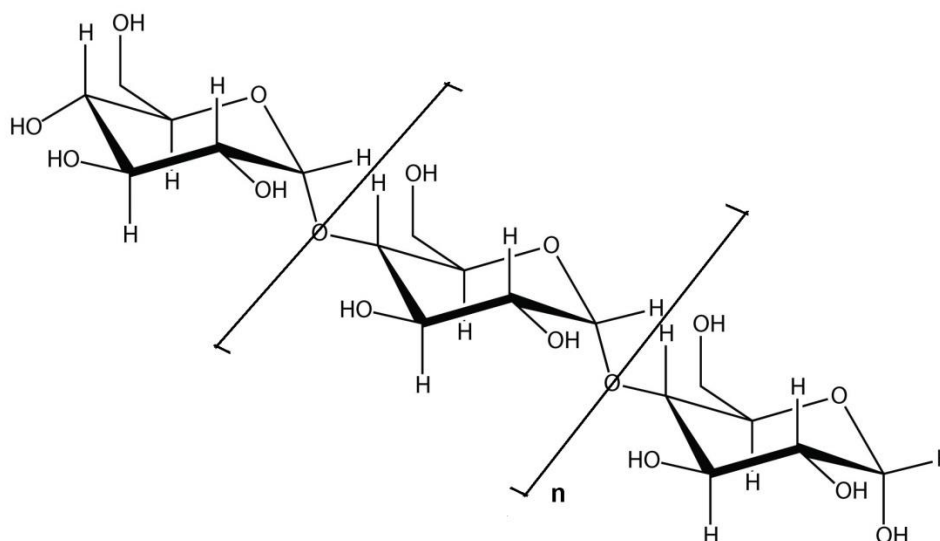


Figura 2. Ilustração de uma molécula de glicose em destaque. Fonte: adaptado de (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).

A amilopectina, por sua vez, tem uma estrutura altamente ramificada, constituída por cadeias de amilose, de grau de polimerização entre 10 e 60 unidades de glicose. Estas cadeias são conectadas entre si por ligações $\alpha(1,6)$. As unidades de glicose com ligações $\alpha(1,6)$ da amilopectina, representam apenas 5 % do total das ligações da amilopectina. A amilopectina apresenta grau médio de polimerização superior a um milhão (Whistler e Daniel, 1984).

Morfologicamente o amido do arroz é composto por grânulos poliédricos com tamanhos de 2 a 8 μm . Quanto a sua superfície, esta irá variar de acordo com o processamento recebido pelo grão, como moagens ou tratamentos químicos (Fabian *et al.*, 2010).

Os grânulos de amido são insolúveis na água fria. A água, quando penetra nas áreas amorfas do grânulo, forma ligações de hidrogênio com os grupos hidrófilos livres da molécula de amido. Estas ligações são uma força fraca, mas o número de ligações no grânulo é tão alto que impede sua dissolução (Swinkels, 1985). Portanto, os grânulos de amido aumentam de volume levemente na água fria (10 a 15 % do diâmetro), mas este aumento é reversível por secagem. Quando a temperatura da suspensão é maior que a força de ligação de hidrogênio, o grânulo de amido começa a aumentar seu volume irreversivelmente e ocorre a gelificação. Na gelificação ocorre formação de ligações entre moléculas de água e grupos hidroxilas, liberados pela entrada de água. A gelificação de um amido é o primeiro passo para o processo de hidrólise, pois as enzimas atacam muito lentamente o amido granular. Desta forma, no processo de hidrólise do amido, ocorre o rompimento deste polímero natural em seus monômeros, que são as moléculas de glicose (Thiebault e Colonna, 1988).

Na Figura 3 podem ser visualizadas as moléculas de glicose, onde a ligação entre duas moléculas de glicose dá origem a uma molécula de maltose, com apenas um radical redutor, no C1, uma vez que a ligação glicosídica se dá pela reação entre o C1 de uma molécula de glicose e o C4 da outra. Desta forma, à medida que ocorre a polimerização das unidades de glicose para sintetizar o amido, as extremidades redutoras diminuem e o polissacarídeo se torna cada vez menos redutor (Surmely *et al.*, 2001).

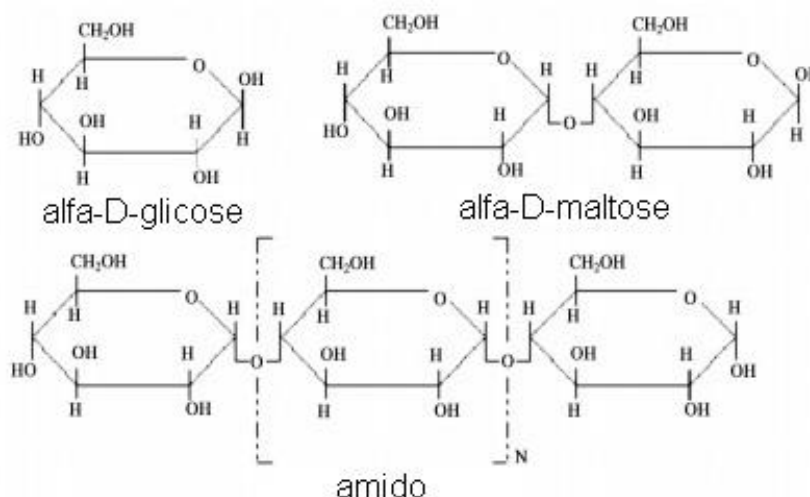


Figura 3. Tipos de ligações entre moléculas de glicose para formação de maltose e amido. Fonte: adaptado de (Surmely *et al.*, 2001).

O número de extremidades redutoras nos indica a polimerização da molécula de amido. Por convenção, considera-se que o valor redutor da glicose é de 100%. Ao se medir as extremidades redutoras do amido e seus produtos de hidrólise, os resultados serão expressos em glicose equivalente ou dextrose equivalente (DE). Quanto maior o valor de DE, maior o efeito de hidrólise ou despolimerização do amido (Surmely *et al.*, 2001).

2.4 Comportamento térmico

2.4.1 Decomposição

O perfil de decomposição térmica do amido contido no arroz pode ser dividido em três etapas. Na primeira a decomposição ocorre com uma variação grande de temperatura, correspondendo a desidratação da amostra de amido. A segunda e terceira etapas ocorrem consecutivamente, variando entre temperaturas de 210 a 540°C. A 302°C o amido do arroz tem a maior taxa de decomposição e consequente perda de massa, de aproximadamente 45% (Fabian *et al.*, 2010).

2.4.2 Gelatinização

A gelatinização do amido do arroz tem início em 67°C, com um pico em torno de 73°C. A esta temperatura, a molécula do amido aumenta seu volume

irreversivelmente e perde a sua forma cristalina, isto após as regiões amorfas do amido forem fundidas ou submetidas à transição vítrea (Bao e Bergman, 2004).

2.4.3 Hidrólise enzimática

As enzimas são os agentes mais importantes nas reações de hidrólise. São compostos de natureza proteica que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica (Chaplin e Bucke, 1990). As enzimas permitem também alcançar rapidamente o estado de equilíbrio da reação, por diminuir a energia de ativação e aumentar assim a velocidade. As enzimas não sofrem modificação durante reação e ao final de cada ciclo voltam a apresentar a mesma atividade (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).

As enzimas podem apresentar uma especificidade reacional, podendo catalisar um tipo de reação, como na hidrólise das ligações α -1,4 glicosídicas do amido ou uma especificidade restrita a um substrato, não podendo atacar moléculas diferentes, mesmo com estrutura semelhante (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises, ou hidrolases, e mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido (Mercier, 1985). Abaixo, segue a caracterização de duas das mais importantes enzimas hidrolíticas.

α -amilase: endo enzima que catalisa especificamente e ao acaso, capaz de hidrolisar as ligações α -(1-4) do amido, mas não pode hidrolisar as ligações α -(1-6). Esta enzima transforma o amido em α -dextrinas de alto peso molecular. A ação da α -amilase sobre a amilose produz apenas dextrinas. A α -amilase é considerada uma enzima liquidificante, porque reduz drasticamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).

Glucoamilase ou amilo-1,6-glicosidase: é uma enzima liquidificante e sacarificante, que hidrolisa completamente o amido em glicose a partir de uma extremidade não redutora. É a única capaz de hidrolisar ao mesmo tempo as ligações α -(1-4) e α -(1-6). O resultado da conversão enzimática do amido por glucoamilase é a transformação total em unidades de glicose (Berg, Stryer e Tymoczko, 2014).

2.5 Fermentação

2.5.1 Tipos de processo

Na indústria a produção de etanol ocorre, de modo geral, através de dois métodos distintos: método de produção por batelada e método de produção contínuo. O processo quando em escalas maiores deve, ao longo de toda sua planta, possuir sistema de recuperação de etanol volatilizado, como por exemplo, nas dornas de fermentação. Em plantas industriais menores, normalmente a fermentação é operada em dornas de fermentação abertas, havendo perdas de etanol durante o processo, entretanto, insignificantes considerando a capacidade produtiva. Porém, este fato não extingue a necessidade de um estudo de viabilidade da implantação de sistemas de recuperação do álcool (Duarte, Lourenço e Riveiro, 2006).

O processo de produção de etanol por batelada primeiramente exige o desenvolvimento e estabelecimento do agente que irá realizar a produção de etanol propriamente dita, através de leveduras. Para tanto, se faz necessário um pé-de-cuba. Este pé-de-cuba consiste em preparar um meio de cultura, que deve preferencialmente ser do mesmo material a ser fermentado, estabilizando temperatura, pH, concentração de açúcares e o que mais convier para a plena adaptação das leveduras neste meio. Feito isso, inocula-se o micro-organismo responsável pelo processo e respeita-se um período para que ele se adapta e se desenvolva plenamente neste ambiente, para só então ser adicionado à matéria-prima (Schmidell e Facciotti, 2001).

O processo em batelada ainda permite um maior controle quanto à assepsia do processo. Ao fim de cada batelada os equipamentos e tubulações podem ser esterilizados e um novo pé-de-cuba pode ser iniciado, diminuindo a possibilidade de contaminações. Ao mesmo tempo, processos não contínuos apresentam rendimentos menores que em processos contínuos, também pelo fato de que a cada troca de pé-de-cuba a especificidade dos micro-organismos em consumirem aquela matéria-prima específica e conversão em álcool diminui, pois novas estirpes são inoculadas e um novo processo de adaptação é exigido (Schmidell e Facciotti, 2001). Mas essa prática nem sempre é realizada. Para não perder a especificidade dos micro-organismos adaptados ao meio, pode-se manter em torno de 10 a 20% do volume das dornas como pé-de-cuba para a fermentação seguinte.

A fermentação por processo contínuo se caracteriza por possuir entradas de matéria-prima e saída de produto ininterrupta. Um processo com estas características, de modo geral, apresenta três partes: uma primeira etapa de tratamento e condicionamento do meio, as dornas de fermentação e a recuperação do agente fermentativo com separação do produto (Viegas, 2003). Os custos de instalação são maiores se comparados ao processo em bateladas, por exigir equipamentos com instrumentos de controle de variáveis mais sofisticados e ainda requer pessoal com qualificação técnica capaz de operar tais plantas produtivas (Atala *et al.*, 2000).

2.5.2 Agente fermentativo

Existem algumas espécies de bactérias que são capazes de produzir álcool, como é o caso da *Zymomonas mobilis*. Entretanto, o micro-organismo mais comumente utilizado para o fim de produção de etanol são as leveduras, especialmente as do gênero *Saccharomyces* (Lima, Basso e Amorim, 2001).

Os micro-organismos do gênero *Saccharomyces* são fungos especializados, monocelulares, desclorofilados, que se multiplicam por gemação, partindo de uma célula mãe dando origem a outra e possuem dimensão de 2 a 8 μm de diâmetro. Possui funções metabólicas múltiplas que devem ser conhecidas e respeitadas para se obter o melhor desempenho na produção de etanol (Lima, Basso e Amorim, 2001). Estes seres são utilizados desde a antiguidade para fins fermentativos. Com o avanço da tecnologia, esta levedura passou a ser um dos grupos de micro-organismos mais estudados pela comunidade científica (Andrietta, Steckelberg e Andrietta, 2006).

De modo geral, as leveduras possuem uma exigência nutricional de uma fonte elaborada de carbono, como é o caso da glicose ou outro açúcar. Esta fonte carbonada lhe fornece energia química e o esqueleto carbônico de sua estrutura, composto prioritariamente de carbono, oxigênio e hidrogênio (Harrison, 1971). Uma gama de nutrientes é necessária para a boa nutrição da levedura e para o bom desenvolvimento da fermentação, como carbono, o nitrogênio e o fósforo (Menezes, 1980). As leveduras do gênero *Saccharomyces* utilizam o nitrogênio na sua forma amoniacal, amídica, caso da uréia, ou amínica, na forma de aminoácidos. Nitratos e proteínas são pouco acessíveis. O enxofre pode ser assimilado na forma de sulfito,

sulfato ou tiosulfato. Já o fósforo é absorvido, principalmente, na forma do íon H_2PO_4^- , forma predominante em pH 4,5 (Amorim, 2005).

2.5.3 Reações envolvidas

A fermentação alcoólica é um processo pelo qual algumas espécies de micro-organismos obtêm sua fonte energética para manutenção e reprodução. A energia provém de reações aeróbias, para o crescimento de leveduras, por exemplo, ou anaeróbias, produzindo álcool e CO_2 (Lima e Marcondes, 2002).

Os substratos podem ser provenientes de fontes endógenas e exógenas. No caso de fontes endógenas, são de origem da própria levedura, como glicogênio e trealose. As fontes exógenas são de fonte externa, ou seja, fornecidas a levedura, como sacarose, glicose, frutose e outros (Lima, Basso e Amorim, 2001).

A rota metabólica da transformação de sacarose em etanol e CO_2 pelas leveduras envolve 12 reações, cada uma catalisada por uma enzima específica. Um esquema do metabolismo da levedura pode ser visto na Figura 4. Este aparato enzimático se encontra no citoplasma da célula, consistindo assim o ambiente celular onde ocorre todo o processo de transformação (Lima, Basso e Amorim, 2001).

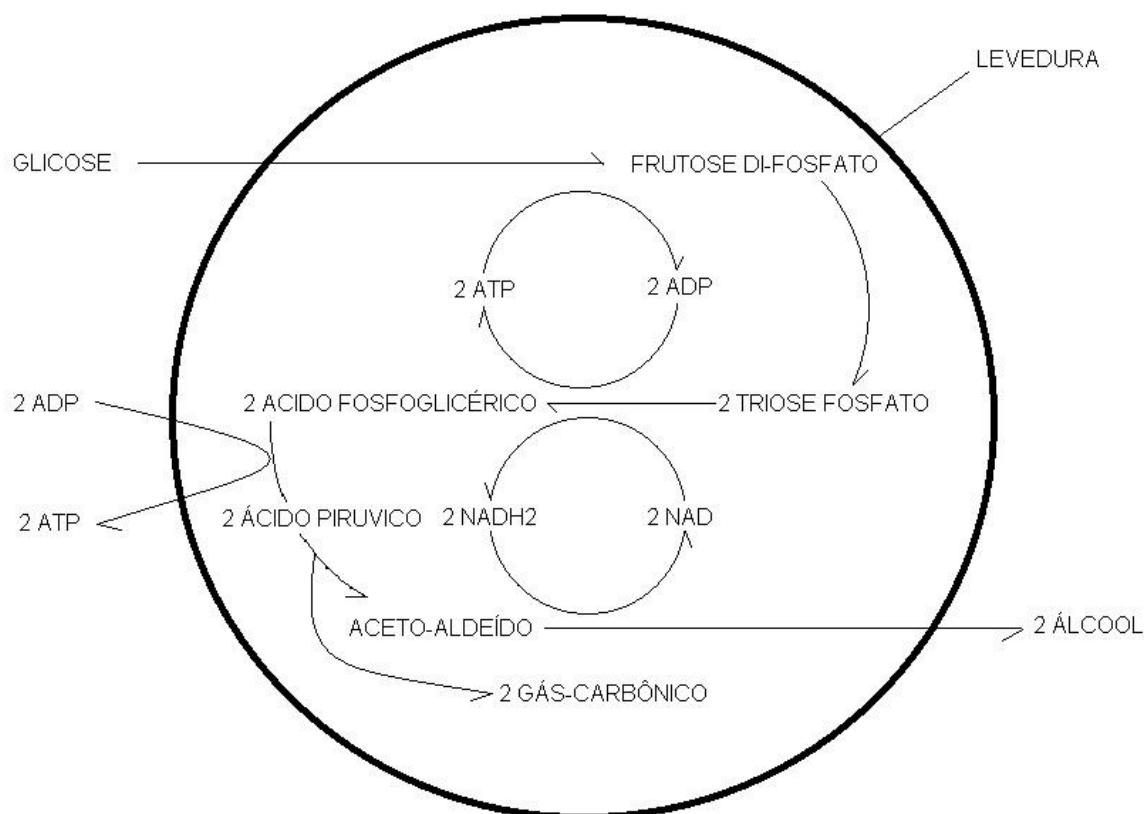


Figura 4. Sequência resumida de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: adaptado de (Lima, Basso e Amorim, 2001).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise. Nesta rota, uma molécula de glicose é metabolizada e duas de piruvato são produzidas. Em condições de ausência de oxigênio o piruvato é convertido a etanol com o desprendimento de CO_2 . Dois ATPs (adenosina trifosfato) produzidos na glicólise são utilizados para a biossíntese de moléculas pela levedura. Sem o consumo contínuo de ATP com vistas ao crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente devido ao acúmulo intracelular de energia (ATP), inibindo a fosfofrutoquinase, importante enzima reguladora da rota (Bai, Anderson e Moo-Young, 2008).

O metabolismo anaeróbico do açúcar tem como objetivo gerar energia, ATP, que será consumido em diversas funções fisiológicas da levedura, como absorção e excreção, e para a biossíntese de varia biomoléculas necessárias a manutenção e

reprodução celular. O etanol e o CO₂ constituem em produtos de excreção, sem utilidade metabólica em anaerobiose (Lima, Basso e Amorim, 2001).

Utilizando uma molécula de hexose como substrato, o rendimento teórico, em base mássica, é 0,511 para etanol e 0,489 para CO₂ (Bai, Anderson e Moo-Young, 2008).

2.5.4 Fatores intervenientes

Vários fatores influenciam o bom andamento de um processo fermentativo. Fatores físicos, como temperatura e pressão osmótica; fatores químicos, como pH, concentração de oxigênio, de nutrientes e de álcool e, ainda, fatores biológicos, como espécies e linhagens utilizadas como agentes, concentração de células e contaminações. Estes fatores são determinantes para um bom rendimento de produção de etanol ou até a perda de uma batelada inteira ou interrupção de um processo (Lima, Basso e Amorim, 2001).

De modo geral, a temperatura ótima para fermentação varia em torno dos 34°C, entre 25 e 36°C. Esta faixa de temperatura proporciona o ambiente ideal para o melhor desempenho das leveduras, uma vez que ela somente irá proporcionar o rendimento desejado se as condições ambientais estiverem no mínimo satisfatórias. Temperaturas mais altas que a faixa exigida favorecem o desenvolvimento de bactérias que podem ocasionar a contaminação do meio assim como na viabilidade celular quanto a sua sinergia com a concentração de álcool e pH (Silva-Filho *et al.*, 2005).

No que diz respeito ao pH ideal de desenvolvimento das leveduras, a faixa ótima se encontra entre 4 e 5, inibindo assim o desenvolvimento das bactérias contaminantes do meio (Menezes, 1980).

Quanto à influência de aditivos, é importante salientar que para a normal atividade da α -amilase é fundamental a presença de íons cálcio. Para Teodoro e Martins (2000), a adição de cálcio ao meio é fundamental para otimizar o crescimento da enzima. Em um experimento, os autores adicionaram 10 mM de cálcio em um meio de cultura para *Bacillus amyloliquefaciens* com o objetivo de produzir α -amilase, obtendo aumento significativo no crescimento da bactéria assim como na produção da enzima. Ainda segundo os autores, estes resultados são semelhantes aos descobertos por outros pesquisadores.

2.6 Estado da arte

Apar e Özbek (2005) avaliaram as condições de operação durante a hidrólise na inativação da α -amilase produzida por *Bacillus spp.* O grau de hidrólise (%) e a atividade residual da enzima (%) foram investigados versus as variáveis pH, temperatura, viscosidade, velocidade de agitação no reator, tempo de processo e materiais adicionados como maltose e glicose, testando-se em várias faixas e utilizando modelos matemáticos para avaliação.

A temperatura ótima para a hidrólise do amido pela α -amilase foi de 65°C. A esta temperatura o grau de hidrólise foi de 94% e a atividade enzimática residual foi de 66%. O pH ótimo encontrado foi de 6,5, representando um grau de hidrólise de amido e atividade enzimática residual de 82 e 68%, respectivamente. Quanto a velocidade no reator, 200 rpm foi a mais adequada, com os valores de grau de hidrólise de amido e a atividade enzimática residual obtidos de 84 e 79,5%, respectivamente. Vale ressaltar que uma diminuição significativa na atividade relativa, ou seja, uma desnaturação, foi observada devido ao aumento da velocidade do rotor (Apar e Özbek, 2005).

No que diz respeito ao tempo, após 90 minutos observou-se que a atividade da enzima ficou em 18,2% e hidrólise foi de 84,5%. Quanto à concentração de enzima, notou-se que acima de 1,2g enzima/L, não foi observado aumento significativo no grau de hidrólise de amido. Estes resultados indicam que uma concentração no intervalo de 1,2-2,0g enzima/L deve saturar os grânulos de amido com moléculas de enzima ativa. O aumento da atividade residual da enzima foi relacionado com um aumento na viscosidade por adição de glicerol na solução da reação. No entanto, reduções foram observadas no grau de hidrólise devido a uma limitação da taxa de transferência de massa. A adição de maltose e glicose representou um aumento na atividade enzimática residual, enquanto que o grau de hidrólise foi diminuído (Apar e Özbek, 2005).

Watanabe *et. al.* (2009) trabalharam com resíduos da indústria do arroz, especialmente os da drenagem de lavagem e farelo de arroz com vistas à produção de etanol. Para o preparo do material à fermentação utilizaram uma combinação de enzimas e um processo ultrassônico de tratamento. Foi alcançada uma produção de etanol da ordem de 6,2% (v / v).

Outro experimento analisou a importância da amilose e da amilopectina para a digestibilidade do amido em grãos de arroz cozido. Os autores Syahariza *et. al.* (2013) deduziram que correlações significativas são observadas entre a taxa de digestão do amido e características estruturais moleculares da amilose e amilopectina. A taxa de digestão *in vitro* tende a aumentar quanto maior for a ramificação da amilose e quanto menor for a razão entre comprimento das ramificações de amilose e amilopectina para as ramificações curtas de amilopectinas, embora as análises estatísticas indicam que são necessários outros dados para estabelecer certeza nos dados.

Yamada *et al.* (2011) realizaram um teste utilizando uma variedade japonesa de arroz de alto rendimento e uma estirpe de levedura capaz de expressar amilase em processo fermentativo direto, sem qualquer pré-tratamento, adição de enzimas ou de nutrientes. A produção de etanol alcançou índices de 1,1g/l/hr, um rendimento de 101% e 5 vezes mais que um processo utilizando milho e nutrientes adicionais. O tempo de processo foi de 24 horas e a levedura poliplóide que expressa amilase demonstrou-se suficientemente robusta para o processo.

A interferência do cozimento à sacarificação e a fermentação foi analisada por Zhang *et. al.* (2012), que utilizou enzimas de uma variedade mutante de *Aspergillus niger* para a sacarificação, utilizando matéria amilacea advinda de batata-doce e a viscosidade do hidrolisado ficou bem inferior ao do caso da matéria prima pré-aquecida. O resultado foi que após a fermentação, com *Zymomonas mobilis*, obteve-se 14,4 g de etanol a partir de 100 g de batata doce, ou 87,2% de rendimento teórico.

3 METODOLOGIA

3.1 Matéria-prima

A amostra de arroz utilizada nos experimentos foi obtida junto a uma cooperativa que beneficia o grão em grande escala, localizada na cidade Rio Pardo – RS, consistindo de arroz quebrados, não nobres, denominados quirela, não destinados ao consumo humano, na quantidade de 50 KG.

3.1.1 Granulometria

Para realizar a análise granulométrica, a amostra de arroz foi triturada em moinho planetário, durante 5 minutos.

Posteriormente, a análise granulométrica foi realizada com peneiras padronizadas do tipo Tyler (série Tyler), de abertura de malhas e espessura dos fios específicas. Foi utilizado peneiras de 200, 100, 60, 48, 32 e 28 mesh. Uma peneira de 200 malhas por polegada, caracteriza-se por mesh 200. Foi utilizado um equipamento vibrador de peneiras automatizado.

O ensaio consistiu em colocar a amostra sobre a peneira mais grossa a ser utilizada agitando-se o conjunto de peneiras colocadas umas sobre as outras na ordem decrescente da abertura das malhas. Abaixo da última peneira foi posto um recipiente que recolhe a fração contendo as partículas mais finas do material.

As quantidades retidas nas peneiras e na panela foram pesadas em balança de precisão. A fração de cada tamanho (x_i) foi calculada dividindo a massa (m_i) pela massa total da amostra (M).

$$x_i = \frac{m_i}{M}$$

Esta fração foi caracterizada como a fração que passou pela peneira $i-1$ e ficou retida na peneira i .

3.1.2 Quantificação do amido

O arroz utilizado foi o moído em moinho planetário. Para a quantificação do teor de amido foi realizado a determinação conforme a Figura 5.

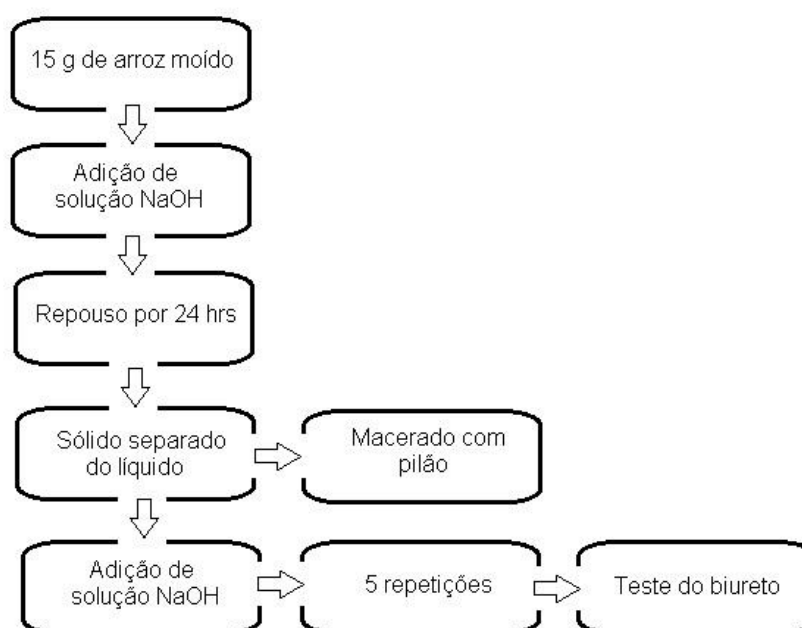


Figura 5. Fluxograma da metodologia para quantificação de amido.

Para cada repetição foi feito o teste do biureto, para verificar a remoção das proteínas do arroz. O teste consistiu em uma solução de biureto previamente preparada. Para tanto, a uma alíquota de 1 ml do líquido sobrenadante juntou-se 4 ml da solução de biureto. A medida que as proteínas de cada lavagem são removidas do líquido sobrenadante, a solução passa de cor roxa a azul. Cor azul indica que as proteínas foram removidas da biomassa, permanecendo o amido do sólido.

Após a remoção total das proteínas, o sólido restante foi lavado com água deionizada até a remoção do NaOH, verificado com adição de indicadores na água de lavagem. Por último foi realizada a lavagem com etanol.

O sólido foi reservado em placas de Petri e seco em estufa a 65 °C até peso constante.

3.2 Determinação dos açúcares e etanol

As determinações dos açúcares e do etanol foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (em inglês, High Performance Liquid Chromatography, HPLC). As alíquotas retiradas a cada hora durante a hidrólise enzimática foram centrifugadas e, posteriormente, levadas para análise por HPLC, equipamento marca Shimadzu, com detector RID - A10, coluna RHM H+ Monosaccharides. A análise foi conduzida com temperatura de forno de 85 °C, volume injetado 5 µL, fluxo de 0,6 ml/min, pressão máxima de 210 kgF/cm², tempo de corrida de 20 minutos e fase móvel em água ultra pura.

3.3 Hidrólise/sacarificação

Para o processo de hidrólise/sacarificação, a amostra foi cozida a 100° C por 15 minutos antes da adição das enzimas.

Foram realizados testes para o ajuste do pH no meio acidificado com solução de ácido fosfórico e com o meio tamponado com citrato de sódio até o pH indicado como ideal pelo fabricante. Primeiramente foi testado com meio tamponado e os resultados obtidos indicaram a necessidade de trabalhar com meio em água. A utilização das enzimas em sequência, uma após a outra, seguiu orientação do fabricante.

Para o processo de liquefação e início da sacarificação foi utilizada uma α-amilase obtida a partir de produção por *Bacillus licheniformis*, de nome comercial Liquozyme Supra 2.2X. A metodologia empregada respeitou as instruções do fabricante do produto, Novozymes (2008). Para a sequência do processo, foi utilizada a enzima exo-1,4-alfa-D-glucosidase (glucoamilase), obtida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*, de nome sistemático alfa-1,4-D-glicano glucohidrolase, comercialmente denominada AMG 300L e a metodologia também obedeceu a instruções do fabricante, conforme (Novozymes, 2002).

No teste, a hidrólise em meio tamponado com pH 6, foi utilizada a Enzima Liquozyme em concentrações de 0,378 e 1,134 KNU (unidades de α-amilase, com atividade padrão de 300 KNU/g – correspondentes a 1 e 3 µl, respectivamente) e a temperaturas de 70 e 90°C. Os experimentos foram conduzidos até 2 horas. Com a enzima AMG foi realizado no mesmo meio após a ação da liquozyme com a solução tamponada a pH 4,5. A concentração da enzima utilizada foi de 0,45 e 0,75 AGU

(unidades de amiloglicosidade, com atividade padrão de 300 AGU/ml – correspondentes a 1,5 e 2,5 µl, respectivamente) e as temperaturas foram de 50 e 60 °C em até 2 horas de reação, completando 4 horas de reação. O percentual de biomassa utilizado foi de 5% (m/v). Foram 16 experimentos diferentes, cada um realizado em triplicata.

Com o meio acidificado foram realizados testes com as enzimas sendo utilizadas em sequência, considerando as condições que apresentaram melhor rendimento na etapa com meio tamponado. Para tanto, para este experimento, realizou-se 6 repetições.

3.4 Fermentação

Após a hidrólise e sacarificação da amostra de arroz, a fase líquida foi fermentada com *Saccharomyces cerevisiae* para produção de álcool, conforme metodologia de Vancov et al. (2015).

Em frascos autoclaváveis de 100 ml com tampa foram adicionados 50 ml do hidrolisado, 0,1g de fosfato monopotássico, 0,025g de extrato de levedura e 0,05g sulfato de magnésio. Autoclavou-se este conjunto a 121°C por 30 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 0,25g da levedura, de nome comercial Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast. Os recipientes foram incubados em Shaker, marca Marconi MA420, a 30°C, agitação de 100 rpm até 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata. Amostras foram coletadas durante este período em intervalos de 1 hora nas primeiras 8 horas e após no tempo 16, 17, 23 e 24, para avaliar a concentração de etanol e açúcares remanescentes por HPLC conforme item 3.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Granulometria

Os resultados para a análise granulométrica estão dispostos na Figura 6, abaixo. Nota que 75,9% da amostra de arroz triturada passou pela peneira com mesh 32 e ficou retida na peneira de mesh 48.

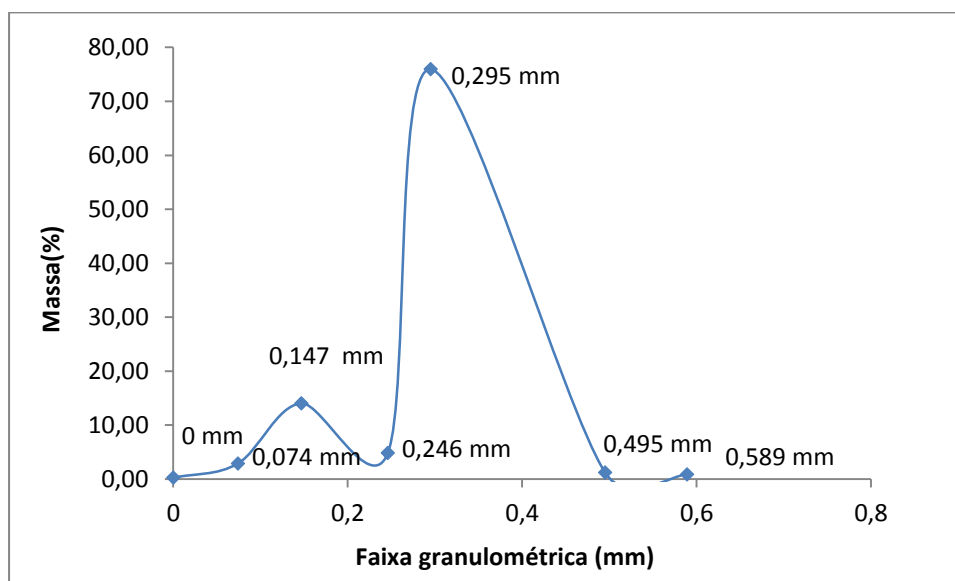


Figura 6. Resultado do teste em Série Tyler para granulometria.

Segundo Antunes e Rodriguez (2006), a menor granulometria dos grânulos de amido aumenta seu grau de solubilidade otimizando a disponibilidade do amido à ação das enzimas. Quanto menor a granulometria, maior é a área de contato da amostra. Desta forma, processos que reduzem o tamanho da partícula facilitam a posterior hidrólise.

4.2 Quantificação do amido

O resultado dos testes de concentração de amido na amostra de arroz apresentou concentração média de 80,14%.

A média de concentração de amido encontrada nas amostras testada, está de acordo com o encontrado por Frei *et al.* (2003), que obteve média entre 74,12% em arroz integral, 87,58% para o arroz branco polido e no parboilizado polido, 85,08%.

Frei *et al.* (2003) defende ainda que o teor de amido pode variar devido a fatores genéticos e ambientais. Desta forma, diferentes cultivares da planta e condições de cultivo influenciam a sua composição, da mesma forma que o processamento dos grãos, já que o arroz branco polido, o parboilizado polido e o integral apresentam diferentes concentrações de amido.

Syhariza (2013) encontrou em seus testes, teores de amido em grãos de arroz variando de 76% a 86%, sem diferenças significativas entre todas as amostras de grãos de arroz testadas.

Destaca-se que este percentual de amido encontrado, de 80,14%, foi utilizado para definir o grau de conversão do arroz em glicose após a hidrólise enzimática.

4.3 Hidrólise/sacarificação e fermentação

4.3.1 Hidrólise em meio tamponado

Na Tabela 2 abaixo, seguem os resultados das médias de conversão da enzima Liquozyme agrupados conforme a atividade de enzima e temperatura utilizada no meio.

Tabela 2. Médias das conversões em açúcares totais obtidas pela hidrólise com a enzima Liquozyme.

Atividade da enzima (KNU)	Temperatura (°C)	Média de conversão (%)	Desvio padrão
1,134	70	49,91	2,79
0,378	70	61,04	7,29
0,378	90	63,56	10,97
1,134	90	58,26	3,26

Podem-se visualizar as médias das conversões para os experimentos com relação a temperaturas de 70 e 90 °C e a concentração de enzima adicionado no meio. Nota-se assim que a reação realizada a 90 °C com concentração de enzima de 0,378 KNU alcança o melhor grau de conversão em glicose. De modo geral, a concentração com 0,378 KNU apresentou desempenho mais vantajosa em relação a concentrações maiores. Foi possível mais de 60% de conversão do amido em açúcares. Vale lembrar que os resultados dizem respeito à maltose e outros dissacarídeos, já que glicose não aparece somente com a ação da Liquozyme.

A Enzima Liquozyme, que é uma α -amilase, é responsável por hidrolisar os polissacarídeos, o que acelera a digestão do amido. Ela hidrolisa ligações alfa-1,4-glicosídicas de moléculas de amido, glicogênio e outros alfa-1,4-glicanos, liberando primariamente oligossacarídeos de 6-7 unidades de glicose e posteriormente açúcares redutores promovendo a liquefação das moléculas (Novozymes, 2008).

A Enzima AMG hidrolisa as ligações α -1,4- e α -1,6 no amido liquefeito. Durante a hidrólise, unidades de glicose são removidas passo-a-passo do final não redutor da molécula de substrato. A taxa de hidrólise depende do tipo de ligação assim como do tamanho da cadeia; por exemplo, ligações α -1,4 são hidrolisadas mais rapidamente que ligações α -1,6; e maltotriose e maltose são hidrolisadas em uma taxa mais baixa que os oligossacarídeos maiores. A Enzima AMG é livre de atividade transglicosidade, o que poderia resultar na formação de panose e isomaltose, pela transferência de moléculas de glicose da posição α -1,4 para posição α -1,6; o que novamente resulta em baixo rendimento de conversão (Novozymes, 2002).

Abaixo estão dispostos na Tabela 3 os resultados de conversão da hidrólise em meio tamponado após a ação das duas enzimas.

Tabela 3. Conversão em Glicose do arroz moído com relação à biomassa pesada inicialmente para as duas enzimas utilizadas em sequência.

Experimento	Liquozyme		AMG		Conversão (%)	Similaridade estatística
	Temp. (°C)	Atividade (KNU)	Temp. (°C)	Atividade (AGU)		
1	70	0,378	50	0,45	42,2	a
2	70	1,134	50	0,45	47,8	ab
3	90	0,378	50	0,45	44,0	ab
4	90	1,134	50	0,45	46,8	ab
5	70	0,378	50	0,75	46,7	ab
6	70	1,134	50	0,75	48,5	ab
7	90	0,378	50	0,75	51,6	ab
8	90	1,134	50	0,75	49,7	ab
9	70	0,378	60	0,45	44,5	ab
10	70	1,134	60	0,45	44,5	ab
11	90	0,378	60	0,45	46,5	ab
12	90	1,134	60	0,45	47,4	ab
13	70	0,378	60	0,75	45,0	ab
14	70	1,134	60	0,75	48,6	ab
15	90	0,378	60	0,75	46,3	ab
16	90	1,134	60	0,75	50,9	b

A análise estatística dos dados apresentados na Tabela 3 foi realizada através do Teste Kruskal-Wallis, utilizando o Software Assistat versão 7.7 Beta. Tal teste foi escolhido em função de que nossa análise se baseou na comparação de grupos, com nossos dados sendo categóricos, não paramétricos, ordinais, não pareados, independentes e com população maior que dois.

Os resultados da análise estatística demonstraram que, considerando como hipótese nula (H_0) que os tratamentos provêm de uma mesma população e ao nível de 5% de probabilidade com p -valor < 0.05 , rejeitando H_0 e com H e H -crit definidos, houve dois grandes grupos com similaridade dentre as 16 amostras. Da mesma forma pode-se dizer, ainda conforme os resultados da análise estatística sob as condições apresentadas, que por comparações múltiplas apenas os experimentos 1 e 16 possuem diferença significativa entre si.

O experimento que apresentou a maior conversão após o processo de hidrólise com as duas enzimas foi o de número 7, com 51,6%.

Se comparado os valores de conversão apresentados na Tabela 3 com os da Tabela 2, notamos que existe um declínio. Entretanto, vale reforçar que os resultados da Tabela 2 dizem respeito a maltose e demais dissacarídeos, pois a presença de glicose com a ação da Liquozyme. Na Tabela 3 as conversões apresentadas dizem respeito a glicose.

Além da glicose presente no meio reacional após a ação das duas enzimas trabalha de forma sequencial, destaca-se ainda a presença de demais açúcares, como bem poder ser visto em seguida.

As Figuras 7 e 8 apresentam a relação dos açúcares ao longo da hidrólise com meio tamponado. Pode-se observar uma relação entre o tempo de aparecimento da glicose e a adição da enzima AMG, assim, à medida que cresce a concentração de glicose há um decaimento na concentração de maltose. Isso se explica pelo tipo de hidrólise que a enzima AMG realiza, quebrando moléculas de maltose em glicose. Nota-se ainda nos cromatogramas obtidos por HPLC, que os compostos formados na hidrólise com a Liquozyme não incluem a glicose, formando-se principalmente maltose.

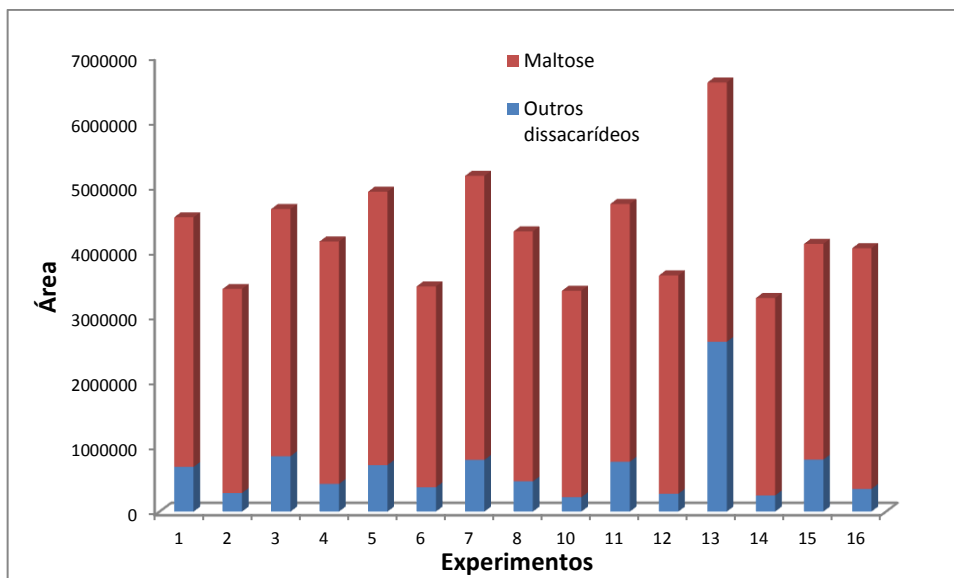


Figura 7. Relação dos compostos formados para a hidrólise com a liquozyme em meio tamponado.

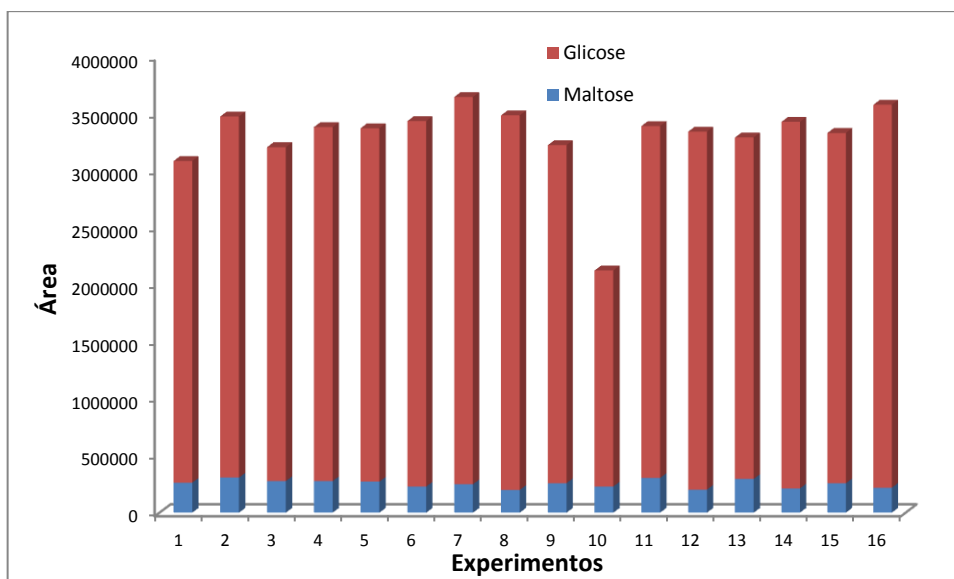


Figura 8. Relação dos compostos formados para a hidrólise com a liquozyme + AMG em meio tamponado.

Na Figura 8, com a adição da enzima AMG, observa-se a formação de glicose, ficando claro que esta enzima realiza a quebra de dissacarídeos, como a maltose.

4.3.2 Hidrólise em meio com pH ajustado com solução ácida

Cabe, primeiramente, observar o fato de que o emprego de tampão citrato de sódio e o cozimento inicial do arroz, que aumenta a viscosidade do substrato e pode ser um fator que leva a erros na determinação. Dessa forma, o emprego de água com o pH ajustado com solução de ácido fosfórico foi uma alternativa para reduzir o erro na determinação dos açúcares após a hidrólise. Esse benefício deve ser considerado, já que o uso do tampão torna o processo mais caro e mais impactante ao meio ambiente.

Considerando as temperaturas de 90 °C e 50 °C; e concentrações de 0,378 KNU e 0,75 AGU, respectivamente para a enzima Liquozyme e para a AMG, foi desenvolvido as análises conduzidas com ajuste de pH através da adição de uma solução de ácido fosfórico ao meio. Os resultados podem ser vistos na Figura 9. É possível notar a conversão de glicose a partir do amido inicial na amostra ao longo do tempo durante a hidrólise.

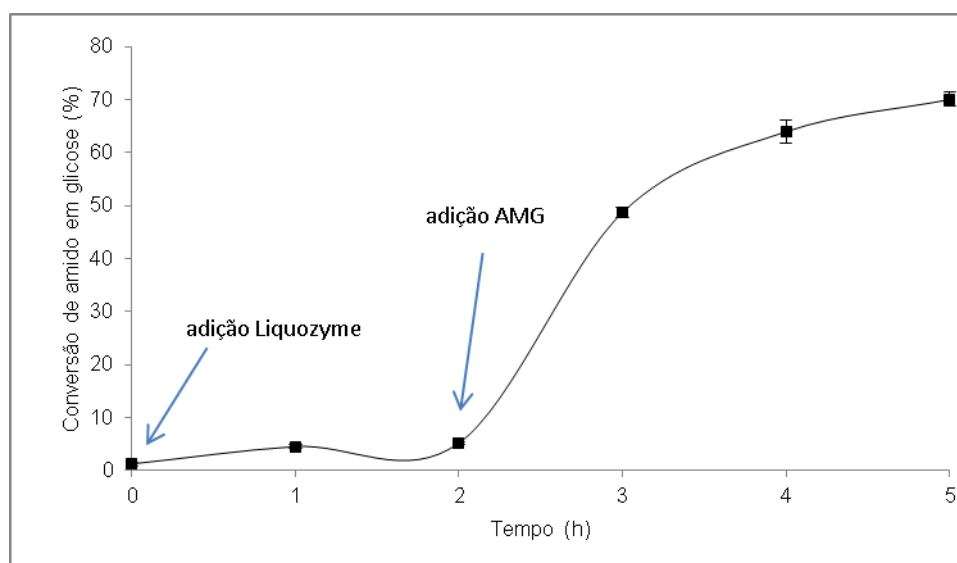


Figura 9. Conversão (%) do amido presente na biomassa em glicose, empregando as enzimas Liquozyme e AMG em sequência.

A relação entre glicose e maltose ao longo da hidrólise, pode ser observada na Figura 10.

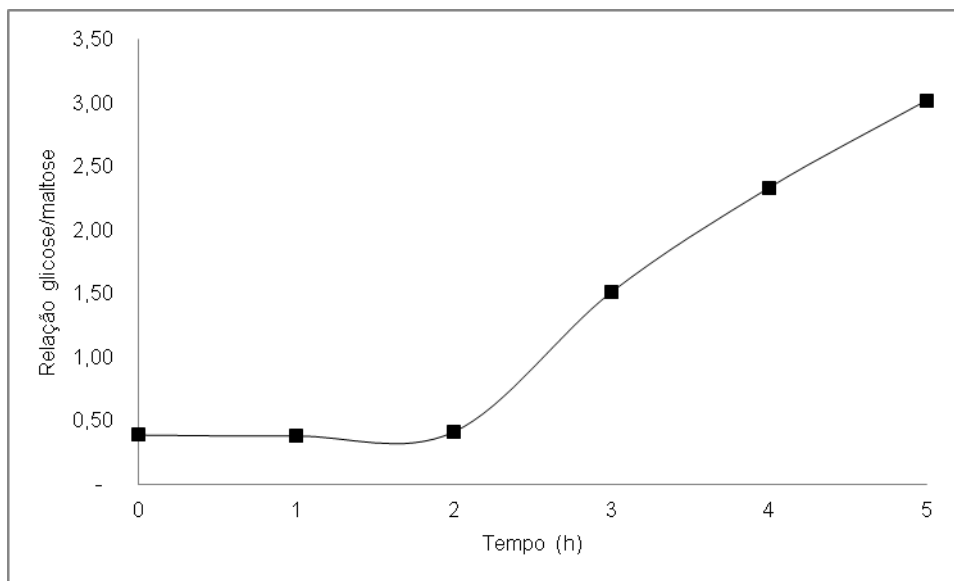


Figura 10. Relação entre o conteúdo de glicose e maltose ao longo da hidrólise empregando as enzimas Liquozyme e AMG em sequência.

Observando os gráficos, fica claro que a partir da adição da Enzima AMG a conversão em glicose é fortemente otimizada ao mesmo tempo em que cai a concentração da maltose.

A conversão média máxima chega em 70% no tempo de 5. A conversão média de amido em glicose no momento da dição da enzima AMG era 5,18%, e com 1 hora de ação da segunda enzima saltou para 48,7%, demonstrando a eficiência da AMG em quebrar as moléculas em glicose.

Analisando o gráfico da relação entre glicose e maltose, nota-se que assim que a enzima AMG é adicionada ao meio, a relação quase quadruplica, saltando de 0,42 para 1,51.

Os resultados obtidos condizem com os encontrados por Surmely et. al. (2001), no caso teórico de hidrólise total de amido em moléculas de glicose, 1g de amido daria 1,1g de glicose, com rendimento de 110%. Esse aumento de rendimento é dependente do DE (Dextrose Equivalente), que corresponde também à porcentagem de moléculas de água que entram nas cadeias do amido. Por exemplo, a conversão enzimática de um amido em glicose de DE 38 apresenta rendimento de 103,8%.

Quanto à atividade das enzimas durante a hidrólise, Yamada (2011) defende que, se comparado com outras matérias-primas, a atividade de amilases e glucoamilases são maiores no arroz, numa relação de 0,7/1. Este fato se deve a

presença de íons de metal, especialmente íons cálcio, e é provável que estes íons estabilizem a amilase na presença de concentrações elevadas de etanol. Tal estabilização iria garantir o funcionamento contínuo das enzimas e pode contribuir para a produção de etanol relativamente mais elevado para o arroz. A glucoamilase apresentou atividade de cerca de 1,6 maior no arroz do que em amostras de milho.

Além disso, Watanabe (2009) obteve conversão em açúcares para o amido de arroz na ordem de 5,4g/L de glicose e 6,7g/L, com 3h de incubação a 15°C. O autor comenta que lipídios e proteínas existentes no farelo de arroz podem inibir o processo de sacarificação enzimática. Em vista disto, foi avaliado a ação de enzimas proteases e lipases sobre as amostras de arroz. Foi descoberto que o tratamento com estas enzimas pode remover material lipídico e proteico da superfície das partículas de amido e, em seguida, expor a superfície do amido, aumentando assim a acessibilidade da enzima hidrolítica ao grânulo de amido. Importante ressaltar que a hidrólise de grânulos de amido é determinada por uma área de superfície específica, não pela concentração da massa. Assim, os grânulos de amido de arroz, no trabalho deste autor, foram dispersas utilizando um ultra-sonicador para aumentar a superfície específica dos grânulos de amido e permitir a sacarificação do arroz.

Li *et al.* (2013) relata que a hidrólise ácida do amido precisa de muito mais tempo do que a hidrólise enzimática para obter o mesmo grau de rendimento.

Syhariza *et al.* (2013) descreve que com o aquecimento, os grânulos de amido gelatinizam, isto em função da ruptura e desintegração da estrutura granular semi-cristalino através do rompimento das ligações de hidrogênio da molécula. Essa gelatinização aumenta a suscetibilidade do amido a ação das enzimas pois elas acessam mais facilmente o interior dos grânulos. A gelatinização causa o inchaço e a solubilização dos grânulos de amido. Para grãos de arroz, o autor relata que os grânulos de amido cozidos se mantem presos nas matrizes de proteína e nas paredes celulares, inibindo o inchaço e a solubilidade do amido.

4.4 Fermentação

A fermentação foi desenvolvida a partir da metodologia já apresentada e utilizando o hidrolisado oriundo das reações em meio com pH ajustado com solução ácida.

A representação gráfica da conversão em etanol e o comparativo com consumo dos açúcares para a formação de etanol na fermentação estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

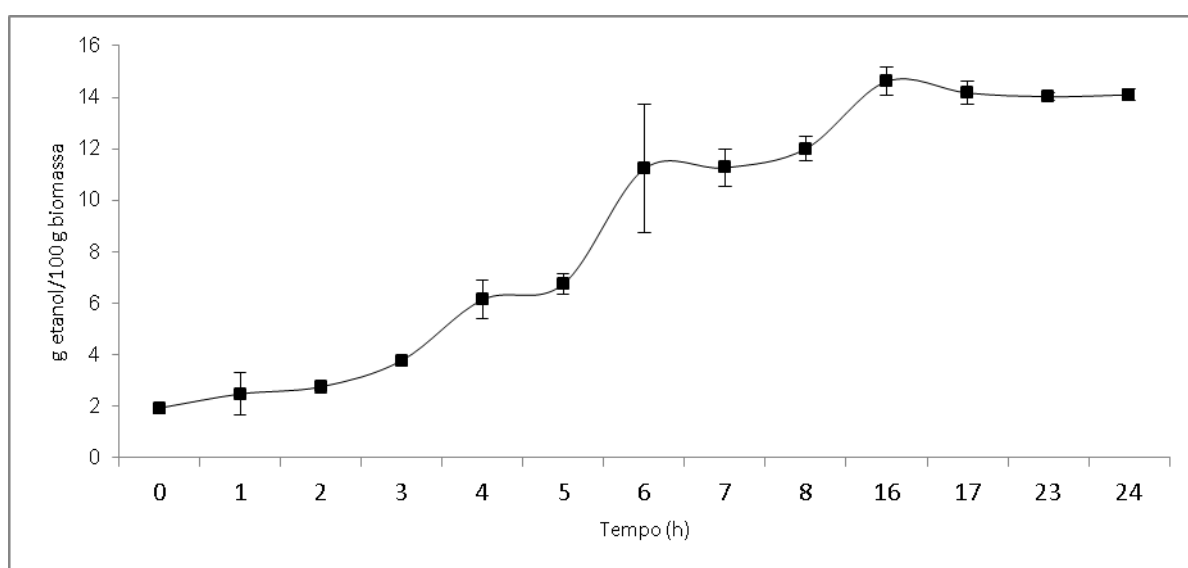


Figura 11. Fermentação do hidrolisado dos grãos de arroz não nobres obtidos empregando a levedura Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast.

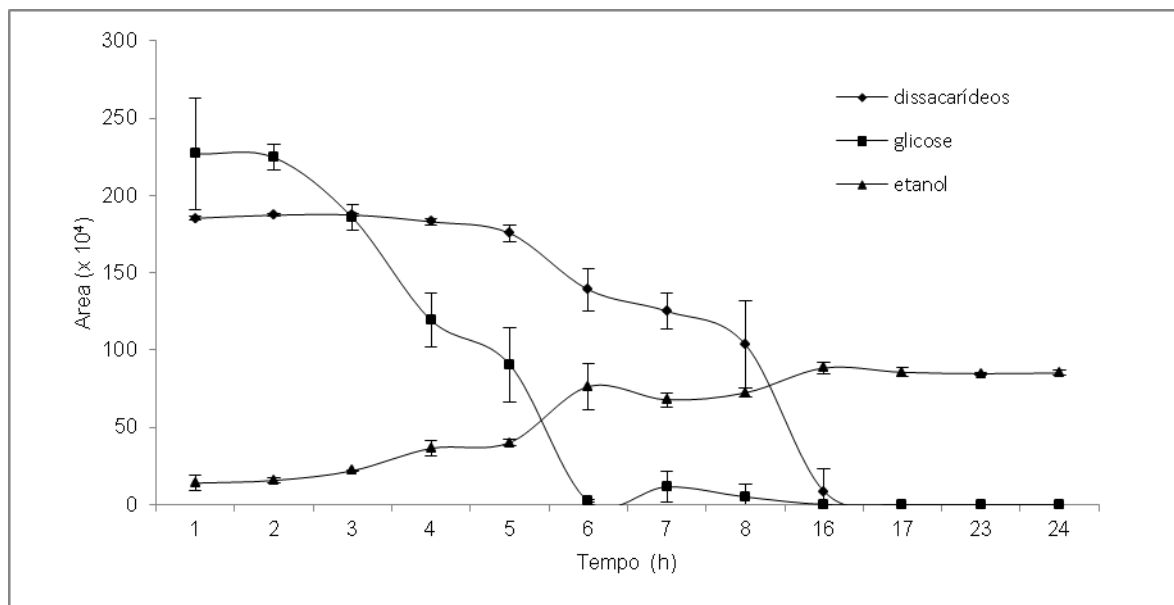


Figura 12. Representação gráfica do comportamento dos açúcares e da produção de etanol durante a fermentação.

Nota-se que às 16 horas de fermentação foi obtido a conversão de 14,61g de etanol para 100g de biomassa inicial (14,61% m/m). As três amostragens seguintes, nos tempos 17, 23 e 24 apresentaram decréscimo na concentração de etanol, provavelmente por perdas de volatilização.

Avaliando o gráfico com o comportamento dos açúcares durante a fermentação, notamos que no tempo 6 a glicose alcançou grande grau de consumo mantendo-se deste momento em diante com declínio suave até zerar, no tempo 16 que é o momento de maior pico na conversão de etanol. Assim como a glicose, os demais açúcares remanescentes também zeraram sua concentração no decorrer do tempo 16.

Zhang (2012) fermentou amido hidrolisado de batata-doce sem pré cozê-lo. A concentração de etanol no fermentado aumentou para 13,2% (v/v), maior concentração apresentada, a 60h após a inoculação da levedura. Afim de comparação, o autor citou que a produção de etanol a partir de amido de batata-doce pré cozido apresentou o mesmo rendimento, entretanto em menor tempo, 48h de processo. A taxa de conversão etanol/glicose obtida pelo autor para os 19,8g de etanol foi 43,4% (massa/massa, isto é, 19,8g/45,6g), representando 85% da taxa de conversão teórica (51,1%).

Yamada (2011) utilizou uma levedura geneticamente modificada capaz de expressar amilases nos seus testes de hidrólise/fermentação. A produtividade de etanol obtida ao longo de um período de 24h utilizando uma estirpe de arroz foi de 1,1g/L/h, cerca de 5 vezes maior do que a obtida com uma amostra de milho, que foi de 0,2g/L/h. Testando diferentes tipos de arroz, a produção de etanol obtido para o integral (96%) foi maior do que os rendimentos obtidos em arroz branco polido ou amido de milho cru. Quanto à estirpe de levedura que não produz amilase, a produtividade e rendimento de etanol foi de 0,1g/L/h, e 10%, respectivamente, indicando que a levedura que expressa amilases facilita a fermentação, tanto para o milho quanto para o arroz. O autor avaliou ainda a influência da proporção de acréscimo de nutrientes na produtividade de álcool. Embora a produtividade de etanol ao longo de um período de 24h foi maior para o inóculo de 20% (1,8g/L/h), em comparação com o inóculo de 10%, o rendimento de etanol obtido usando o inóculo de 10% (86%) foi mais elevada. Estes resultados mostram claramente que um rendimento razoável na fermentação no que diz respeito à eficiência e custos pode ser conseguido sem adição de nutrientes ou enzimas separadamente.

Watanabe (2009) adicionou farelo de arroz a uma quantidade de água de lavagem dos grãos e avaliou o rendimento em etanol. A conversão em etanol aumentou quando o farelo de arroz foi adicionado à água de lavagem para 0,8-1,2% usando 3-5g de farelo de arroz em 30 ml de água de lavagem.

De modo geral, os resultados de conversão para hidrólise e fermentação podem ser visualizados na Figura 13, apresentando um fluxograma final para o trabalho.



Figura 13. Fluxograma com os rendimentos finais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados alcançados neste trabalho, se comparados com a literatura, estão dentro da normalidade. Os produtos utilizados desempenharam seus papéis conforme prometido e o trâmite experimental decorreu sem maiores problemas.

O anseio inicial do trabalho de buscar respostas e números quanto a produção de etanol a partir de arroz não nobre foi alcançado, mas, o passo mais importante se dá daqui para adiante.

Analisar estes dados no que diz respeito aos custos e sua viabilidade econômica, nesta escala laboratorial e posteriormente fazer o exercício de aumentar a escala para um possível piloto e por fim para a aplicação prática industrial, são os maiores desafios por vir.

Otimizar o processo, racionalizar o uso de energia, experimentar possíveis reações a frio, sem que se precise adicionar calor, pensar a sustentabilidade ambiental do processo, são, por exemplo, desafios que se apresentam.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica - ciência e tecnologia.** Fermentec. Piracicaba - SP: 448 p. 2005.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. **Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda.** MultiCiência - Universidade de Campinas 2006.

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis:** www.anp.gov.br p. 2015.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M. **Metabolismo dos carboidratos não estruturais.** Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep: BERCHIELLI, T. T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G.: 231-236 p. 2006.

APAR, D. K.; ÖZBEK, B. α -Amylase inactivation during rice starch hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1367-1379, 3// 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204002183> >.

ATALA, D. I. P. et al. **Fermentação alcoólica com alta de densidade celular: modelagem cinética e convalidação de parâmetros.** Livro de resumos do XIII Congresso Brasileiro de Química 2000.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks.** Biotechnology Advances. 26: 89-105 p. 2008.

BAO, J.; BERGMAN, C. J. **The Functionality of Rice Starch.** Starch in Food: Structure, Function and Application 2004.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica.** 7. 2014.

BRASIL. **Decreto nº 59.190** 8 de Setembro de 1966.

_____. **Decreto nº 19.717** 20 de fevereiro de 1931.

CARLOS EDUARDO DE SOUZA, T.; MEIRE LELIS LEAL, M. Culture conditions for the production of thermostable amylase by Bacillus sp Condições de cultura para produção de amilase termoestável por Bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 298-302, 2000. ISSN 1517-8382.

CASTRO, E. M. et al. **Qualidade de grãos em arroz.** Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás: 30 p. 1999.

CGEE. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro: 2008. 316.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press: 1-6; 80-82; 146-151 p. 1990.

DENATRAN. Departamento Estadual de Trânsito do Estado do Rio Grande do Sul. p. www.detran.rs.gov.br, Acesso em: 15 de outubro de 2015.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação - Biotechnology Department. Portugal 2006.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**: www.embrapa.br p. 2015.

FABIAN, C. et al. **Isolation and characterization of starch from defatted rice bran**. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 42: 86 - 91 p. 2010.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistical databases**: www.fao.org p. 2015.

FREI, M. **Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines**. Food Chemistry. 83 2003.

GODDARD, M. S. **The effect of amylose content on insulin and glucose responses to ingested rice**. American Journal of Clinical Nutrition. 39: 388 - 392 p. 1984.

HARRISON, J. S. **Yeast production - progress in industrial microbiology**. London - Colchester and Beccles. Cap. 4: 129 - 178 p. 1971.

HEINEMANN, R. J. B. **Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil**. Journal of Food Composition and Analysis. 18: 287 - 296 p. 2005.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz: www.irga.rs.gov.br p. 2015.

ITANI, T. **Distribution of amylose, nitrogen, and minerals in rice kernels with various characters**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 5326 - 5332 p. 2002.

JULIANO, B. O. Rice in human nutrition. Rome, p. www.fao.org, 1993. Acesso em: 30 de setembro de 2015.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. **The rice grain and its gross composition**. Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists: 17 - 57 p. 1985.

KENNEDY, G. **Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries**. International Rice Commission Newsletter. 51: 33 - 42 p. 2002.

LI, H. et al. Impact of α - amylase combined with hydrochloric acid hydrolysis on structure and digestion of waxy rice starch. **International journal of biological macromolecules**, v. 55, p. 276, 2013.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Curitiba: Editora UFPR: 2002.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: 2001.

LUMEN, B. O.; CHOW, H. **Nutritional quality of rice endosperm**. Rice utilization. New York: Van Nostrand Reinhold: LUH, B. S. 2: 363 - 395 p. 1995.

MAISTRO, M. C. M. **Desafios e perspectivas para o setor sucroenergético do Brasil**. São Carlos: EdUFSCar 2011.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Evolução da produtividade e da produção de cana-de-açúcar no Brasil por safra. 2012.

MATSUO, T. **Science of the rice plant**. Food and Agriculture Policy Research Center. Tokyo. 2 - Physiology: 1245 p. 1995.

MENEZES, T. J. B. **Etanol - o combustível do Brasil**. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo: 141-178 p. 1980.

MERCIER, C. **Les enzymes amylolytiques**. Hydrolases et dépolymérase - Enzymes d'intérêt industriel. Paris: MOURANCHE, A. COSTES, C: 109 - 142 p. 1985.

NABESHIMA, H. A.; EL-DASH, A. **Modificação química da farinha de arroz como alternativa para o aproveitamento dos subprodutos do beneficiamento do arroz**. Boletim do CEPPA. Curitiba. 22: 107 - 120 p. 2004.

NOVOZYMES. **Ficha técnica - AMG 300 L** 2002.

_____. **Ficha de informação do produto - Liquozyme Supra 2.2X** 2008.

SAIKUSA, T. D. **Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 1122 - 1125 p. 1994.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. São Paulo: 2001.

SILVA-FILHO, E. A. et al. **Yeast population dynamics of industrial fuel ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting**: 13-23 p. 2005.

STORCK, C. R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. 2004. 108 Mestrado em Ciência e

Tecnologia de Alimentos - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

STORCK, C. R.; SILVA, L. P. D.; COMARELLA, C. G. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE GRÃOS DE ARROZ. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 259-264, 2009. ISSN 0103-4235.

SURMELY, R. et al. Hidrólise do amido. In: (Ed.). **CULTURAS DE TUBEROSAS AMILÁCEAS LATINO AMERICANAS**: Fundação Cargil, v.3 - Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas, 2001. cap. 15, p.377 - 448.

SWINKELS, J. J. M. **Sources of starch, its chemistry and physic**. *Starch, sources, chemistry, and physics*. New York: Marcel Dekker: 15 - 46 p. 1985.

SYAHARIZA, Z. A. et al. The importance of amylose and amylopectin fine structures for starch digestibility in cooked rice grains. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 742-749, 2013. ISSN 0308-8146.

THIEBAULT, J. F.; COLONNA, P. **Propriétés fonctionnelles: pectines et amidon, dans Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires**. *Les cahiers de l'ENSBANA*: 157 - 171 p. 1988.

TRAN, T. U. **Analysis of the tastes of brown rice and milled rice with different milling yields using a taste sensing system**. *Food Chemistry*. 88: 557 - 566 p. 2004.

UFRGS. Terra de Arroz. p. www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/gr_divisao.htm, Acesso em: 30 de março de 2015.

UNITED NATIONS ORGANIZATION FOR FOOD AND AGRICULTURE, S. F. **Forest and Energy, Key Issues**. Rome: 154 p. 2008.

VANCOV, T. et al. Potential use of feedlot cattle manure for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 120-128, 2015. ISSN 0960-8524.

VASCONCELOS, G. F.; VIDAL, J. W. B. **Poder dos Trópicos: Meditação sobre a Alienação Energética na Cultura Brasileira**. São Paulo: Editora Casa Amarela Ltda, 1998. 303.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica continua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. 2003. 150 Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. **Arroz: composição e características nutricionais**. *Ciência Rural*. Santa Maria. 38: 1184 - 1192 p. 2008.

WATANABE, M. et al. Bioethanol production from rice washing drainage and rice bran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 524-526, 12//

2009. ISSN 1389-1723. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172309002916>>.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. **Molecular structure of starch.** Starch: chemistry and technology. New York: Academic Press: 153-182 p. 1984.

YAMADA, R. et al. Direct and efficient ethanol production from high- yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4, p. 393-396, 2011. ISSN 0141-0229.

ZHANG, P. et al. Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, 2012. ISSN 0960-8524.