



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RENAN ATANÁZIO DOS SANTOS

**ESTUDO CINÉTICO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DO HIDROLISADO DE
FARINHA DE MANDIOCA UTILIZANDO COMPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO
MOSTO**

Maceió - AL

2013

RENAN ATANÁZIO DOS SANTOS

**ESTUDO CINÉTICO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DO HIDROLISADO DE
FARINHA DE MANDIOCA UTILIZANDO COMPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO
MOSTO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Maria
Rosas Garcia Almeida

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Karla
de Souza Abud

Maceió - AL

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- S237e Santos, Renan Atanázio dos.
Estudo cinético de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto / Renan Atanázio dos Santos. – 2013.
102 f. : il.
- Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Coorientadora: Ana Karla de Souza Abud.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2013.
- Bibliografia: f. 93-102.
1. Amido – Hidrólise. 2. Etanol – Produção. 3. Fermentação etanólica – Eficiência. 4. Hidrólise ácida. 5. Hidrólise enzimática. 6. Processo de fermentação – Cinética. I. Título.

CDU: 663.15:661.722

RENAN ATANÁZIO DOS SANTOS

ESTUDO CINÉTICO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DO HIDROLISADO DE
FARINHA DE MANDIOCA UTILIZANDO COMPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO
MOSTO

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Alagoas, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em Engenharia
Química

Aprovada em: Maceió, 27 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Renata Almeida

Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(PPGEQ/UFAL – Orientadora)

Ana Karla de Souza Abud

Prof^a. Dr^a. Ana Karla de Souza Abud
(PPGEQ/UFAL - Coorientadora)

João Nunes de Vasconcelos

Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos
(PPGEQ/UFAL)

Elaine Albuquerque

Prof^a. Dr^a. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque
(UFBA - Membro Externo)

A minha família, por ter me ensinado tudo que sou, me apoiando, me incentivando e por todo amor e carinho que recebi em todos os momentos da minha vida.

A minha noiva Glaize Martins, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Aos meus amigos que sempre confiaram em mim e estiveram do meu lado.

Com muito carinho, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, me guiando pelos caminhos certos, dando-me paciência e forças para superar os tantos obstáculos que surgem em minha vida, abençoando a mim, minha família e a todos.

A minha família por ter me apoiado em todos os momentos, em especial aos meus pais, irmãos e minha noiva.

A Prof^a. Dr^a. Renata, pela orientação, parceria, compreensão nos momentos de adversidade e pelo voto de confiança e incentivo, além da disposição de ensinar e transmitir seu conhecimento sem medir esforços.

A Prof^a. Dr^a. Ana Karla, pela co-orientação, valiosas sugestões e contribuições para o andamento e conclusão deste trabalho, estando sempre à disposição para ajudar sem medir esforços.

Ao Prof. Dr. João Nunes, pela participação, sugestões e contribuição com os conhecimentos passados em suas aulas, desde a graduação. Meu respeito e admiração.

A Prof^a. Dr^a. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque pela participação e colaboração.

Ao Prof. Dr. Wagner, pelo apoio, amizade e pelos conselhos que contribuíram muito para meu crescimento.

Aos colegas do LTBA e do LEEQ, pelo companheirismo, carinho e gentileza, em especial a Margarete pelas contribuições técnicas e pelo constante incentivo durante a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram e sempre estiveram juntos nessa caminhada.

Enfim a todos que de alguma forma colaboraram para a concretização de mais um sonho.

RESUMO

O etanol é um biocombustível ambientalmente correto, obtido de diversas fontes renováveis, que podem ser matérias-primas açucaradas, amiláceas ou celulósicas. Um dos fatores que influenciam na multiplicação celular e na eficiência de transformação de açúcar em etanol é a necessidade nutricional das leveduras durante o processo de fermentação etanólica. A utilização de mandioca para a fabricação de etanol apresenta-se como alternativa, gerando, principalmente, a melhoria na distribuição de renda nas regiões de baixa densidade populacional. Todavia, ainda é necessário estudos para aprimoramento do processo, contribuindo para sua viabilidade. Este trabalho avalia a cinética da fermentação dos hidrolisados ácido e enzimático, com e sem complementação nutricional, obtidos da mistura de dois tipos de farinha de mandioca cultivada no município de Junqueiro-AL. As fermentações foram conduzidas em batelada simples, em estufa à 30°C, com levedura comercial (fermento Fermix), vendida na forma de fermento em pó seco, e complementação nutricional feita com nutriente utilizado nas destilarias do estado. A cinética do processo fermentativo foi acompanhada através das determinações de concentração celular (X), sólidos solúveis totais (Brix), açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e etanol (E). Ao final das fermentações foram determinados os parâmetros fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em etanol ($Y_{E/S}$), fator de conversão células em etanol ($Y_{E/X}$), produtividade em etanol (P_E), produtividade em células (P_X), eficiência de fermentação (n_f (%)) e eficiência de processo (n_p (%)). Os resultados mostraram que o emprego dos tratamentos ácido e enzimático na hidrólise da farinha gerou açúcar suficiente para as fermentações, apresentando rendimentos satisfatórios, sendo $80,15\% \pm 0,78$ para a hidrólise ácida e $98,02 \pm 0,26$ para a hidrólise enzimática. Os resultados obtidos no final das fermentações para o meio à base de hidrolisado ácido sem complementação nutricional (HASN), o meio à base de hidrolisado ácido com complementação nutricional (HACN), o meio à base de hidrolisado enzimático sem complementação nutricional (HESN) e o meio à base de hidrolisado enzimático com complementação nutricional (HECN), nessa ordem, foram: 48,09, 48,11, 49,59 e 49,45 g/L para a concentração de etanol; 1,57, 1,57, 1,63 e 1,60 g/L.h para a produtividade em etanol (P_E); 80,23, 82,19, 84,15 e 80,23% para a eficiência de fermentação (n_f (%)); e 76,46, 76,37, 82,40 e 79,86% para a eficiência de processo (n_p (%)).

Palavras-chave: Amido. Hidrólise. Fermentação etanólica - Eficiência. Cinética.

ABSTRACT

Bioethanol is an environmentally friendly fuel, obtained from different renewable sources, which can be sweetened raw materials, starch or cellulose. One of the factors that influence cell proliferation and transformation efficiency of sugar into ethanol is the need of nutritional yeast during ethanol fermentation processes. The use of cassava for the production of ethanol as an alternative presents itself, generating mainly the improvement in income distribution in regions of low population density. However, further study is needed to process improvement, contributing to its viability. This study evaluates the fermentation kinetics of enzymatic and acid hydrolysates with and without nutritional supplementation, obtained mixing two types of cassava grown in the municipality of Junqueiro-AL. Fermentations were conducted in simple batch in oven at 30°C, with commercial yeast and nutritional supplement made with nutrient used in distilleries in the State. The kinetics of the fermentation process was monitored by determining the cell concentration (X), total soluble solids (Brix), reducing sugars (AR), total reducing sugars (ART) and ethanol (E). At the end of fermentation parameters were determined conversion factor substrate in cells ($Y_{X/S}$), conversion factor substrate in ethanol ($Y_{E/S}$) conversion factor cell in ethanol ($Y_{E/X}$), ethanol productivity (P_E), cells productivity (P_X), fermentation efficiency (n_f (%)) and process efficiency (n_p (%)). The results showed that the use of acid and enzymatic hydrolysis treatment of flour generated sufficient sugar for the fermentations, showing satisfactory yields, being $80,15\% \pm 0,78$ for the acid hydrolysis, and $98,02 \pm 0,26$ for enzymatic hydrolysis. The results obtained at the end of fermentation for the medium based of acid hydrolyzate without nutritional supplementation (HASN), the medium based of acid hydrolyzate with nutritional supplementation (HACN), the medium based of enzymatic hydrolyzate without nutritional supplementation (HESN) and the medium based of enzymatic hydrolyzate with nutritional supplement (HECN), in that order, were: 48,09, 48,11, 49,59 and 49,45 g/L for ethanol concentration; 1,57, 1,57, 1,63 and 1,60 g/L.h for productivity in ethanol (P_E); 80,23, 82,14, 84,15 and 80,23% for the fermentation efficiency (n_f (%)); and 76,45, 76,37, 82,40 and 79,86% for process efficiency (n_p (%)).

Keywords: Starch. Hydrolysis. Ethanol fermentation - Efficiency. Kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas tecnológicas para produção de etanol	20
Figura 2 - Representação da cadeia de amilose e amilopectina	24
Figura 3 - Fluxograma do processamento da mandioca para produção de farinha	36
Figura 4 - Caminhão de transporte de raízes	37
Figura 5 - Equipamento de lavagem e descasque de raízes	37
Figura 6 - Descasque manual na atualidade	38
Figura 7 - Triturador de raízes em operação	38
Figura 8 - Ralador de mandioca	39
Figura 9 - Prensa hidráulica em operação.....	39
Figura 10 - Prensagem da mandioca ralada.....	40
Figura 11 - Peneira de massa prensada em operação.....	40
Figura 12 - Forno de secagem	41
Figura 13 - Pesagem e envase da farinha de mandioca	41
Figura 14 - Classificação das enzimas amilolíticas	44
Figura 15 - Classes de enzimas amilolíticas e mecanismo de ação sobre a molécula de amido	45
Figura 16 - Variação de S, X e P com tempo em um processo fermentativo descontínuo.....	51
Figura 17 - Evolução da concentração celular (X) com o tempo para os meios HA, HE e YPD	75
Figura 18 - Evolução do Brix com o tempo para os meios HA, HE e YPD	76

Figura 19 - pH dos meios de fermentação durante os processos fermentativos	78
Figura 20 - Perfil de concentração de açúcares redutores (AR) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos	78
Figura 21 - Perfil de concentração de açúcares redutores totais (ART) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos..	79
Figura 22 - Perfil de concentração celular (X) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos	80
Figura 23 - Curva de crescimento celular dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos.....	80
Figura 24 - Perfil de concentração de etanol dos meios de fermentação durante os processos fermentativos.....	82
Figura 25 - Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado ácido sem complementação nutricional (HASN)	83
Figura 26 - Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado ácido com complementação nutricional (HACN)	83
Figura 27 - Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado enzimático sem complementação nutricional (HESN).....	84
Figura 28 - Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado enzimático com complementação nutricional (HECN)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre amilose e amilopectina	25
Tabela 2 - Composição química da raiz de mandioca, em massa seca.....	30
Tabela 3 - A produção mundial de mandioca.....	31
Tabela 4 - Produção e rendimento médio - confronto das safras de 2011, 2012 e das estimativas para 2013	32
Tabela 5 - Área plantada, quantidade produzida e rendimento médio de algumas culturas.....	34
Tabela 6 - Concentração de nutrientes minerais no mosto para adequada fermentação etanólica.....	49
Tabela 7 - Comparativo de rendimento de diferentes matérias primas para a produção de etanol.....	54
Tabela 8 - Concentração de açúcares e de amido da mistura das farinhas de mandioca.....	70
Tabela 9 - Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) dos hidrolisados	71
Tabela 10 - Rendimentos das hidrólises	71
Tabela 11 - Concentração celular (X) e Brix com o tempo para os meios, YPD, HA e HE	74
Tabela 12 - Parâmetros de início e fim de fermentação para os meios YPD, HA e HE	76
Tabela 13 - Velocidade específica de crescimento para os diferentes meios de fermentação	81

Tabela 14 - Dados de início e final do processo fermentativo, parâmetros fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em etanol ($Y_{E/S}$), fator de conversão células em etanol ($Y_{E/X}$), produtividade em etanol (P_E), produtividade em células, eficiência de fermentação ($\eta_{f(\%)}$) e eficiência de processo ($\eta_{p(\%)}$)	85
---	----

LISTA DE NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

AR	concentração de açúcares redutores (g/L)
ART	concentração de açúcares redutores totais (g/L)
E	concentração de etanol (g/L)
HASN	meio à base de hidrolisado ácido sem nutriente
HACN	meio à base de hidrolisado ácido com nutriente
HESN	meio à base de hidrolisado enzimático sem nutriente
HECN	meio à base de hidrolisado enzimático com nutriente
P_E	produtividade em etanol (g/L.h)
P_X	produtividade em células (g/L.h)
S	concentração de substrato (g/L)
t	tempo de fermentação (h)
X	concentração celular (g/L)
$Y_{E/S}$	fator de conversão de substrato em etanol (g/g)
$Y_{E/X}$	fator de conversão de células em etanol (g/g)
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em células (g/g)
η_f	eficiência de fermentação (%)
η_p	eficiência de processo fermentativo (%)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Etanol	17
2.2	Matéria-Prima Amilácea	20
2.2.1	Amido	21
2.2.2	Mandioca	28
2.2.3	Farinha de Mandioca	34
2.3	Enzimas	42
2.4	Fermentação Etanólica	46
2.4.1	Agentes de Fermentação Etanólica	46
2.4.2	Fatores que Afetam a Fermentação Etanólica	47
2.4.3	Importância dos Nutrientes para a Fermentação Etanólica	48
2.4.4	Parâmetros Cinéticos Importantes na Fermentação Etanólica	50
2.5	Considerações sobre Produção de Etanol a partir de Matéria-Prima Amilácea	53
2.5.1	Tratamento Ácido	56
2.5.2	Tratamento Enzimático	57
3	OBJETIVOS	59
3.1	Objetivo Geral	59
3.2	Objetivos Específicos	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1	Matéria-Prima	60
4.2	Microrganismo	60
4.3	Nutriente	60
4.4	Hidrólise Ácida	60

4.5	Hidrólise Enzimática.....	61
4.6	Meios de Cultura.....	62
4.6.1	Meio YPD Líquido.....	62
4.6.2	Meio Líquido à Base de Hidrolisado Ácido de Farinha de Mandioca.....	62
4.6.3	Meio Líquido à Base de Hidrolisado Enzimático de Farinha de Mandioca	62
4.7	Preparo do Inóculo	62
4.8	Testes Preliminares de Fermentação Etanólica.....	63
4.9	Ensaio de Fermentação Etanólica.....	64
4.10	Metodologia Analítica.....	64
4.10.1	Determinação de Amido	65
4.10.2	Massa Celular	66
4.10.3	Sólidos Solúveis Totais (Brix)	66
4.10.4	Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)	66
4.10.5	Etanol.....	67
4.11	Cálculo da Eficiência da Hidrólise e dos Parâmetros do Processo	68
4.11.1	Rendimento das Hidrólises	68
4.11.2	Produtividade e Fatores de Conversão Globais	68
4.11.3	Eficiência de Fermentação e de Processo.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	Rendimento dos Processos de Hidrólise	70
5.2	Ensaio de Fermentação Etanólica Preliminar	73
5.3	Fermentação Etanólica.....	77
6	CONCLUSÕES	90
7	SUGESTÕES	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A utilização de etanol como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro. Em primeiro lugar, pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental e, em segundo lugar, como fonte estratégica de energia renovável, em substituição aos derivados do petróleo. O etanol também é muito utilizado na química, sendo, neste caso, requerido um etanol com alto grau de pureza.

Segundo Costa (2010), o etanol teve dois momentos de elevação da produção no Brasil, onde o primeiro se deu logo após a primeira crise do petróleo, com o surgimento do *Proálcool*, e o segundo a partir dos anos 2000, com a introdução dos veículos bicombustíveis no mercado.

O etanol produzido atualmente no Brasil para fins energéticos tem origem, praticamente na sua totalidade, da fermentação de matérias-primas oriundas da cana-de-açúcar (caldo de cana e melaço) pela levedura *Saccharomyces sp* (ABUD, 1997; CEREDA, 2001). No entanto, outras vias para obtenção de etanol têm sido estudadas como uma alternativa para subprodutos advindos de processos com resíduos amiláceos e celulósicos (COSTA, 2010).

Segundo Santos (2008), o desempenho das leveduras na fermentação etanólica é influenciado pelas condições que o meio oferece. Assim, alguns macronutrientes e/ou micronutrientes são adicionados ao mosto, a fim de complementar as deficiências do meio quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras para a máxima transformação dos açúcares.

Devido à grande abundância em todo o mundo, as matérias-primas amiláceas são consideradas fontes alternativas muito promissoras para a produção de etanol por via fermentativa, principalmente em determinadas regiões do Brasil, e também em outros países, onde a cultura da cana-de-açúcar não é recomendada (ABUD, 1997).

A cultura de mandioca ocupa posição de destaque em todas as regiões brasileiras. A farinha, embora seja a forma mais ampla de aproveitamento

agroindustrial da raiz, apresenta comercialização estagnada, sendo necessário oferecer novas alternativas de mercado para os industriais da área (DEMIATE et al., 1997).

O amido é abundantemente encontrado na mandioca, raiz muito utilizada na alimentação humana, que pode ser encontrada tanto na forma *in natura* quanto na industrializada, como fécula e farinha (GONÇALVES et al., 2009). Segundo FAO (2012), a mandioca se constitui em um importante produto agrícola, destacando o Brasil como o segundo maior produtor mundial. Por apresentar elevado teor de amido, também pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol, gerando receita e propiciando melhoria na distribuição de renda nas regiões de baixa densidade populacional (CEREDA, 2001; OLIVEIRA, 2011). Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comumente empregada nas fermentações etanólicas, não é capaz de produzir etanol a partir do amido, por não possuir as enzimas necessárias para a sua hidrólise, sendo necessárias etapas que envolvem a hidrólise do amido. Estas etapas, bem como o estabelecimento de condições de processo para maximizar a produção de etanol ainda são obstáculos a serem vencidos. Por isso, a busca por processos mais aperfeiçoados, que diminuam os custos de produção, bem como a procura por métodos mais eficientes e produtivos são pontos fundamentais para viabilizar a produção de etanol a partir de material amiláceo.

A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta a vantagem de ser mais rápida, porém tem como desvantagens os problemas de corrosão de equipamentos e a necessidade de neutralização (SURMELY et al., 2003). A hidrólise enzimática apresenta as vantagens de ser seletiva, ter bom rendimento, não originar produtos indesejáveis e possuir baixo consumo de energia. Todavia ainda apresenta como desvantagem o custo das enzimas. Pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de encontrar condições que aumentem os rendimentos da hidrólise e diminuam os custos com esta etapa (BENVENGA, 2012; AUGUSTINI; FRANCISCO JUNIOR, 2008; SANTANA, 2007).

Neste contexto, esta dissertação apresenta um estudo cinético da fermentação etanólica, com uma levedura comercial, do mosto proveniente das hidrólises ácida e enzimática da mistura de dois tipos de farinha de mandioca produzidas no Estado de Alagoas, com e sem complementação de nutriente utilizado nas usinas de etanol do Estado.

No capítulo de Revisão Bibliográfica é apresentado um histórico da produção de etanol nos últimos anos, destacando os avanços a partir de matéria-prima amilácea, em especial a mandioca, assim como são apresentadas, também, considerações sobre o amido, enzimas, fermentação etanólica e importância dos nutrientes para o processo fermentativo, além de uma descrição do processamento da mandioca para produção de farinha.

No capítulo Objetivos estão descritos os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

Em Materiais e Métodos são descritos o microorganismo, a matéria-prima, o nutriente, as metodologias de hidrólise ácida e enzimática, os meios de cultura, bem como as técnicas e metodologias utilizadas na obtenção e no tratamento dos resultados obtidos.

No capítulo de Resultados e Discussão são abordadas as etapas de hidrólise ácida e enzimática da farinha de mandioca, destacando as concentrações de açúcar e rendimentos obtidos, a etapa de ensaios preliminares de fermentação, assim como a etapa de fermentações dos meios à base hidrolisado com complementação e sem complementação nutricional, onde são apresentados alguns parâmetros de fermentação, fazendo-se comparação destes parâmetros entre os meios de fermentação utilizados, bem como com valores encontrados na literatura.

O capítulo de Conclusões enfatiza os resultados mais significativos, bem como as principais diferenças em relação aos resultados da literatura.

Por último, o capítulo Sugestões apresenta possíveis atividades para prosseguimento do trabalho, enquanto o capítulo Referências Bibliográficas relaciona os trabalhos e publicações mencionados ao longo dessa dissertação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol

Quimicamente, álcool é um termo genérico aplicado a uma série de compostos formados por átomos de hidrogênio e carbono ligados a um ou mais grupos hidroxila. Na prática, contudo, o termo álcool é a nomenclatura comum do álcool etílico ou etanol, cuja fórmula molecular é C_2H_5-OH (LIMA et al., 2001). Na produção do etanol, no entanto, é necessário diferenciar o etanol anidro (ou álcool etílico anidro) do etanol hidratado (ou álcool etílico hidratado). Segundo a UNICA (2007), a diferença entre o etanol hidratado e o anidro aparece apenas no teor de água contida no etanol. O etanol anidro tem o teor de água em torno de 0,5%, em volume, enquanto o etanol hidratado, vendido nos postos de combustíveis, possui cerca de 5% de água, em volume.

Segundo Aquarone et al. (2001), a difusão da fermentação etanólica no Brasil iniciou-se, aparentemente, na capitania de São Vicente, onde foi montado o primeiro engenho do país, em 1532, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar trazidas da ilha da Madeira. Os autores destacam que por séculos, o único etanol produzido foi empregado como bebida destilada e a industrialização do etanol propriamente dita desenvolveu-se na Europa, em meados do século XIX.

Segundo Leite e Leal (2007), no início do século XX, ocorreram as primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira. Em 1925, surgiu a primeira experiência brasileira com etanol combustível. Em 1933, o governo de Getúlio Vargas criou o Instituto do Açúcar e do Alcool – IAA e, pela Lei nº 737, tornou obrigatória a mistura de etanol na gasolina.

De acordo com Stupiello (1978) *apud* Costa (2010), a indústria alcooleira no Brasil funcionava como indústria subsidiária, tendo em vista manter o equilíbrio econômico quando a demanda de açúcar era menor e a sobra de cana-de-açúcar era transformada em etanol. Porém, com a oficialização do Programa Nacional do Alcool (*Proálcool*), em 1975, devido à crise energética que o mundo atravessava,

houve uma mudança no panorama, colocando a agroindústria entre as mais importantes.

Costa (2010) cita que a utilização do etanol combustível no Brasil remonta ao início da década de 20, mas ganhou maior importância a partir de 1975, com o lançamento do *Proálcool*, em meio à primeira crise do petróleo, ocorrida em 1973. Seu objetivo principal era diminuir as importações brasileiras de petróleo após a crise energética mundial que quadruplicou os preços do petróleo, gerando fortes déficits em conta corrente. O *Proálcool* teve como instrumento o incentivo à produção do etanol oriundo da cana-de-açúcar, da mandioca ou de qualquer outro insumo. A produção e o uso do etanol combustível no Brasil, desde 1975, constitui o mais importante programa de combustível comercial renovável implementado no mundo até hoje (UNICA, 2007).

Oberling (2008) destaca alguns problemas que surgiram a partir da segunda metade da década de 80 e acabaram afetando a credibilidade do *Proálcool*. O autor cita que a dificuldade dos produtores em suprir a aquecida demanda por etanol, combinada com a queda do preço do petróleo, que baixou os preços do barril, fizeram com que o combustível deixasse de ser competitivo com a gasolina. Além disso, os planos econômicos que priorizavam o controle da inflação e do déficit público fizeram com que o governo federal diminuísse os subsídios para os produtores, culminando, ao final da década de 1980, com uma crise de abastecimento que afetou agressivamente o programa. Ainda segundo Oberling (2008), sem perspectiva de continuidade, o programa passou gradualmente ao esquecimento, culminando na saída do Estado do *Proálcool* durante a década de 90, com uma forte desregulamentação do setor sucroalcooleiro, ficando relegado a segundo plano até o início do século XXI.

Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol. De acordo com o tipo de carboidratos presentes nas matérias-primas elas podem ser classificadas em três tipos (Canova, 2011):

- materiais açucarados: contêm açúcares simples como glicose, frutose e maltose. Os dissacarídeos são fermentados após uma hidrólise ocorrida pela ação da enzima invertase, produzida pelo próprio agente de fermentação. Ex.: cana-de-açúcar, beterraba açucareira, melaços, mel de abelhas e frutas;

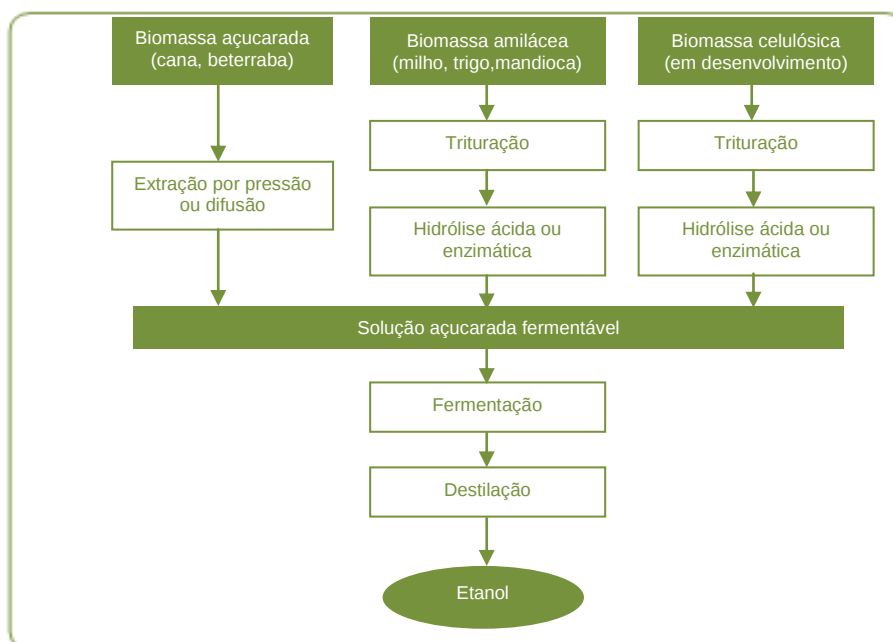
- materiais amiláceos: contêm amido, que pode ser quebrado em glicose pela hidrólise ácida ou enzimática, num processo denominado malteação ou sacarificação. Ex.: grãos amiláceos (milho, sorgo, cevada, trigo), raízes e tubérculos (batata, batata-doce, mandioca);

- materiais celulósicos: são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Para tornarem-se fermentescíveis devem passar por um processo complexo de hidrólise ácida ou de hidrólise enzimática. Ex.: palha, madeira, resíduos agrícola e de fábricas de papel.

O etanol não é encontrado espontaneamente na natureza, podendo ser obtido por diferentes processos, a partir de diversas fontes. No Brasil, a biomassa é a fonte de maior significância, onde se destaca a cana-de-açúcar como matéria-prima para fermentação etanólica pelas leveduras *Sacharomyces sp.* (LIMA et al., 2001).

Segundo Canova (2011), o etanol pode ser obtido por síntese química e por fermentação. Na síntese química, o etanol é produzido por hidrocarbonetos insaturados, como eteno e etino, e de gases de petróleo e hulha e, neste caso, o etanol obtido não é proveniente de matéria-prima renovável e nem pode ser considerado como combustível alternativo. Segundo o autor, a via fermentativa é o método utilizado na obtenção de etanol no Brasil e na maior parte dos países do Mundo.

A Figura 1, apresentada por BNDES (2008), sintetiza as rotas tecnológicas para produção de bioetanol, considerando as diferentes matérias-primas de interesse.

Figura 1- Rotas tecnológicas para produção de etanol

Fonte: Nogueira, 2008.

As diferenças do etanol obtido de diferentes matérias-primas, tais como a cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca, estão restritas às impurezas que o acompanham, que são características de cada matéria-prima, e o grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986). Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. É importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grande quantidade no País (BRINGHENTI et al., 2007).

2.2 Matéria-Prima Amilácea

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato (amido, celulose) constitui-se em matéria-prima em potencial para obtenção de etanol. Os substratos (mostos) têm de ser adequados ao desenvolvimento do microorganismo e à finalidade de sua utilização industrial, que é produzir uma determinada substância. Além de uma composição capaz de suprir as exigências nutricionais microbianas,

para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA et al., 2001).

De acordo com Stupiello (1978) *apud* Costa (2010), as matérias-primas que apresentam maiores possibilidades são geralmente enquadradas em três grupos:

- Açucaradas: melaço de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar, sorgo sacarino (colmo);
- Amiláceas ou feculentas: mandioca, milho, batata, babaçu, sorgo sacarino (grãos);
- Celulósicas: bagaço residual, sabugos, resíduos de madeira, palhas de amendoim.

Abud (1997) destaca a grande abundância de matéria-prima amilácea em todo o mundo, sendo consideradas fontes alternativas muito promissoras para a produção de etanol por via fermentativa, principalmente em determinadas regiões do Brasil, e também em outros países, onde a cultura da cana-de-açúcar não é recomendada.

2.2.1 Amido

O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza, só competindo em quantidade com a celulose (FRANCO et al., 2001).

Swinkels (1985) define amido como um homopolissacarídeo, composto de carbono, hidrogênio e oxigênio, podendo ser considerado um produto da condensação de unidades de anidroglicose. Segundo Motta (2011), o amido é a forma de armazenamento de glicose nas plantas e fonte de combustível para as células do organismo, estando depositado nos cloroplastos das células vegetais como grânulos insolúveis.

O amido encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais como um carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais (40 a 90% do peso seco), leguminosas (30 a 50% do peso seco), tubérculos (65 a 85% do peso

seco) e frutas imaturas ou verdes (40 a 70% do peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006).

Segundo Cunha (2009), entre os amidos mais usuais, incluem-se:

- a) amido de arroz - produto amiláceo extraído de arroz;
- b) amido de milho - produto amiláceo extraído de milho;
- c) araruta - produto amiláceo extraído dos rizomas de diversas espécies do gênero *Maranta* (*Maranta arundinacea*, *M. nobilis*, etc.);
- d) fécula de batata - produto amiláceo extraído da batata;
- e) fécula de mandioca - produto amiláceo extraído da mandioca;
- f) sagu - produto amiláceo extraído de várias espécies de palmeiras.

Segundo Reguly (1996), dois vegetais se destacam, no Brasil, como fonte de amido, que são a mandioca e o milho. O primeiro, como fonte de amido preponderantemente industrial e de preparo de farinha de mesa, enquanto o segundo, como fonte de amidos modificados para a indústria de alimentação e outros fins técnicos. Camargo Filho et al. (2001) destacam, além da mandioca, a batata-doce como amilácea tropical com grande potencial na extração de amido. Segundo os autores, estas são tuberosas muito populares, sendo a mandioca, nos últimos anos, bem explorada pelas fecularias por ser de fácil extração, baixo custo e apresentar outras características desejáveis, tais como fácil propagação e tolerância à estiagem.

Cunha (2009) define amido de mandioca como um pó fino, branco, inodoro e insípido que produz ligeira crepitação quando comprimido entre os dedos. Segundo o autor, o amido de mandioca também é conhecido como fécula, polvilho doce ou goma.

Amido e fécula, quimicamente, referem-se ao mesmo produto, mas em termos tecnológicos emprega-se a terminologia diferenciada; fécula é quando o

amido provém de raízes e tubérculos e o amido é o produto amiláceo extraído das partes aéreas comestíveis dos vegetais (CAMARGO, 1989).

Entre os fatores exógenos que influem nas características do amido estão as espécies, o tempo de cultivo e as condições climáticas. Há, também, indicações de que amidos extraídos de raízes de alguns cultivares de mandioca apresentam características físico-químicas e morfológicas mais constantes ao longo do período de colheita comercial (SARMENTO, 1997).

Segundo Silva (2008), o amido pode ser caracterizado por alguns testes que indiquem a presença de carboidratos, entre eles a reação de Molisch e a reação com iodo que, respectivamente, identificam a presença de carboidrato e a presença de amido.

2.2.1.1 Estrutura

Segundo Costa (2010), o amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos denominados amilose e amilopectina, em proporções que variam entre os amidos procedentes de diferentes espécies vegetais, influenciando na viscosidade e no poder de geleificação do amido. Mesmo entre amidos provenientes da mesma espécie, as proporções de amilose e de amilopectina variam de acordo com o grau de maturação das plantas.

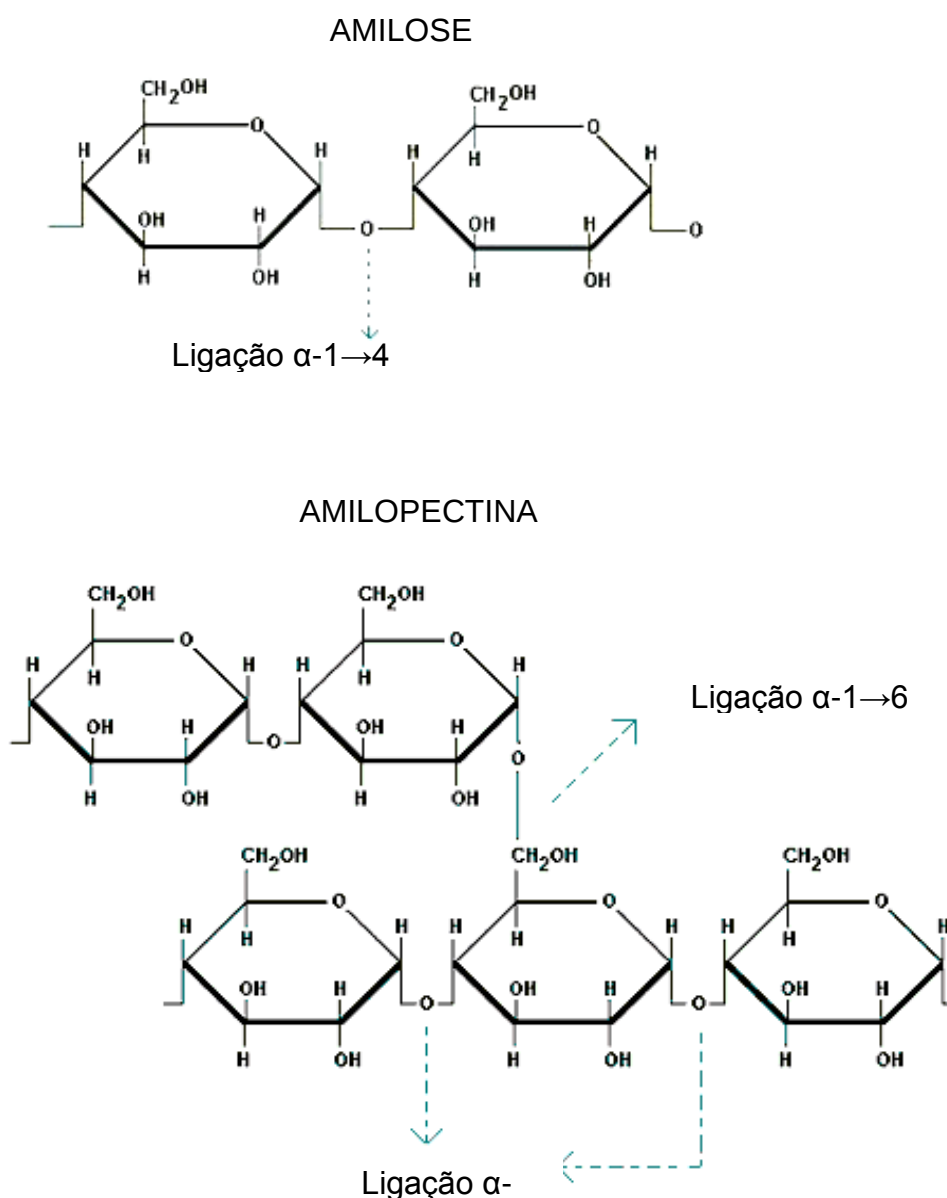
Através da condensação enzimática, uma molécula de água dilui-se entre duas moléculas de glicose. Esta condensação ocorre predominantemente entre carbonos 1 e 4 e ocasionalmente entre os carbonos 1 e 6. Quando somente ligações α -1 $\rightarrow$ 4 se desenvolvem, o homo-polímero resultante possui cadeia linear, sendo denominada amilose. O comprimento desta cadeia varia de acordo com a fonte (planta de onde é extraído), mas em geral possui entre 500 e 2.000 unidades de glicose.

O segundo tipo de polímero existente no amido se desenvolve quando a condensação enzimática entre unidades de glicose ocorre nos carbonos 1 e 6. Esta ligação ocasional, juntamente com as predominantes ligações α -1 $\rightarrow$ 4, resulta em uma ramificação e no desenvolvimento de uma molécula muito maior em tamanho

do que a amilose, mas com comprimentos de cadeias lineares de somente 25 a 30 unidades de glicose. Esta molécula é chamada amilopectina (AMIDOS, 2009).

A diferença básica entre estes dois polímeros é a ramificação da cadeia, como pode ser visto na Figura 2. Ambos possuem cadeias nas quais as unidades de glicose se unem mediante ligações α -1 $\rightarrow$ 4. Por sua vez, a amilopectina apresenta pontos de ramificação com ligações glicosídicas α -1 $\rightarrow$ 6. Tais ramificações são encontradas de 24 a 30 unidades de glicose na cadeia principal (FRANCISCO JÚNIOR, 2008). A Tabela 1 compara a amilose e a amilopectina.

Figura 2 - Representação da cadeia de amilose e amilopectina



Fonte: Souza; Neves, 2013.

Tabela 1 - Comparação entre amilose e amilopectina

	Amilose	Amilopectina
Unidades monoméricas	D-glicose	D-glicose
Peso molecular	4.000 → 500.000	50.000 → 16×10^6
Tipo de polímero	Linear	Ramificado
Pontos de ramificação	-	24 – 30 resíduos de glicose
Ligações glicosídicas	$\alpha (1 \rightarrow 4)$	$\alpha (1 \rightarrow 4)$, $\alpha (1 \rightarrow 6)$

Fonte: Motta, 2011.

Todos os amidos são constituídos de uma ou de ambas as unidades destas moléculas, mas o percentual de uma para outra varia de acordo com a fonte de amido (AMIDOS, 2009).

A funcionalidade do amido, assim como sua organização física na estrutura granular, é, em grande parte, atribuída à proporção destes dois polímeros (BILIADERES, 1991).

As longas cadeias da amilose são estruturas espirais, flexíveis em meio aquoso e têm alta afinidade por iodo. Cadeias de 200 unidades de glicose podem ligar, à temperatura ambiente, até 20% do seu peso em iodo e o complexo resultante tem coloração azul escuro, com máximo de absorção à 620 nm. A amilopectina, por sua vez, tem baixa capacidade de ligação ao iodo, 0,2% (p/p) e o complexo formado tem máximo de absorção à 550 nm (KOSSMANN; LLOYD, 2000). Esta capacidade de ligação de iodo diminui proporcionalmente com a diminuição do tamanho da cadeia do polissacarídeo (KOSSMANN; LLOYD, 2000; BALL; MORREL, 2003).

Atualmente, diversas pesquisas sobre a avaliação da relação existente entre a estrutura molecular do amido e seu comportamento em algumas propriedades físico-químicas sugerem que diversas características estruturais, como teor de amilose, distribuição de comprimento das cadeias de amilopectina e grau de cristalinidade no grânulo poderiam estar intimamente relacionadas aos eventos associados com a gelatinização e a retrogradação, tais como inchamento do

grânulo, lixiviação de amilose e/ou amilopectina, perda da estrutura radial (birrefringência), supra-molecular (cristalinidade) e molecular e recristalização (DENARDIN; SILVA, 2009).

Segundo Leonel e Cereda (1997), a fécula de mandioca é composta de 18% de amilose e 82% de amilopectina, em relação ao total da molécula de amido.

2.2.1.2 Propriedades Físico-Químicas

Durante o processamento e armazenamento, mudanças ocorridas na estrutura do amido influenciam profundamente as suas propriedades funcionais e fisiológicas (COLONNA, *et. al.*, 1992). A quantidade de água, o tempo e a temperatura de armazenamento são variáveis que influenciam no processo de cristalização e afetam diretamente os rendimentos do amido (ESCARPA, *et. al.*, 1996).

Durante o aquecimento em meio aquoso, os grânulos de amido sofrem mudanças em sua estrutura, envolvendo a ruptura das pontes de hidrogênio estabilizadoras da estrutura cristalina interna do grânulo, quando uma temperatura característica para cada tipo de amido é atingida. Se o aquecimento prossegue com uma quantidade suficiente de água, rompe-se a região cristalina e a água entra, fazendo o grânulo romper-se e perder a birrefringência, isto é, não se visualiza mais a cruz de Malta sob luz polarizada. Com a gelatinização, o amido torna-se mais facilmente acessível à ação das enzimas digestivas (LOBO; SILVA, 2003).

Quando os grãos de amido são suspensos em água e a temperatura é aumentada gradualmente até ser atingida à temperatura de geleificação, as ligações enfraquecidas permitem que os grânulos possam absorver água, ocorrendo quebra das ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, o intumescimento do grânulo (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Segundo Cereda (2001), o grau de hidratação está relacionado com o poder de inchamento do grânulo de amido, influenciado pela associação molecular e pela composição química, sendo maior em féculas do que nos amidos de cereais e muito baixa nos amidos com elevados teores de amilose. Quando o amido entra em

contato com a água fria, os grânulos incham ligeiramente (10 a 20%) devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas, mas esse processo é reversível pela secagem (WHO/FAO, 1998 *apud* DENARDIN; SILVA, 2009).

A gelatinização refere-se à formação de uma pasta visco-elástica turva ou, em concentrações suficientemente altas, de um gel elástico opaco. Conforme o tempo passa e a temperatura diminui (na refrigeração ou congelamento, principalmente), as cadeias de amido tendem a interagir mais fortemente entre si, obrigando a água a sair e determinando, assim, a chamada sinérese (LOBO; SILVA, 2003).

Observações microscópicas revelam que a desorganização pelo tratamento térmico de grânulos de amido envolve diversos estágios durante o aquecimento e que cada grânulo apresenta cinética própria. Em condições de umidade intermediária há quantidade insuficiente de água livre e ocorre apenas uma desorganização parcial na população de grânulos, como também das áreas cristalinas dentro dos mesmos, na temperatura de gelatinização a 67°C (CEREDA, 2001).

A eficiência da hidrólise enzimática também depende da temperatura de gelatinização do amido. Como a suscetibilidade do grânulo aumenta consideravelmente com a gelatinização, procura-se hidrolisar o amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização. Entretanto, o aumento da temperatura pode desnaturar a enzima, inibindo sua ação no grânulo. Assim, existe um compromisso entre a temperatura de gelatinização do amido e a resistência térmica da enzima (ALMEIDA, *et. al*, 2007 *apud* CUNHA, 2009).

A recristalização ou retrogradação ocorre quando, após uma solubilização durante o processo de gelatinização, as cadeias de amilose, mais rapidamente que as de amilopectina, agregam-se formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio (LOBO; SILVA, 2003).

Segundo Denardin e Silva (2009), quando é armazenado e resfriado, o amido gelatinizado pode sofrer o fenômeno da retrogradação, que varia de acordo com diversos fatores, como temperatura e tempo de armazenamento, pH, fonte de amido,

presença de outros componentes (lipídios, eletrólitos e açúcares) e condições de processamento. Com o passar do tempo, as moléculas do amido vão perdendo energia e as ligações de hidrogênio tornam-se mais fortes. Assim, as cadeias começam a se reassociar num estado mais ordenado e esta reassociação culmina com a formação de simples e duplas hélices, resultando no enredamento ou na formação de zonas de junção entre as moléculas, formando áreas cristalinas. Com a área cristalizada, altera-se o índice de refração e o gel vai se tornando mais opaco à medida que a retrogradação se processa (ELIASSON, 1996).

As características de retrogradação da amilose e da amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose retrograda mais rapidamente, tendo forte tendência a se reassociar por meio da formação de pontes de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes, formando estruturas cristalinas de duplas hélices quando a solução esfria, mantendo-se por longo período de tempo. A amilose apresenta endoterma de fusão de 140 a 180°C e a presença de ácidos graxos livres ou lipídios favorece a formação de complexos de inclusão. Por outro lado, a amilopectina retrograda numa taxa muito menor durante um longo período de tempo e sua endoterma de fusão é menor, aproximadamente, 45 a 60°C (WU; SARKO, 1978; PARKER; RING, 2001; THARANATHAN, 2002).

2.2.2 Mandioca

A cultura indígena desenvolveu o uso da mandioca antes da chegada dos portugueses, por aproximadamente 10.000 anos. Posteriormente, cientistas e pesquisadores encontraram diferenciados usos para essa raiz (VENTURINI FILHO, 2010).

A mandioca é um arbusto pertencente à ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. É a única, dentre as 98 espécies conhecidas da família Euphorbiaceae, cultivada para fins de alimentação. Estudos indicam que a planta ancestral da mandioca é natural de vegetação de galeria associada a rios, na zona de transição entre a floresta Amazônica e o cerrado, próxima às fronteiras entre Peru e Brasil (CARVALHO, 2005).

A cultura de mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos, tais como fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouca exigência em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, sem grandes perdas na matéria seca (MENEZES, 1980; PRIMO-YUFERA et al., 1995). Segundo Coveney e Santich (1997) *apud* Venturini Filho (2010), o uso de agrotóxicos é dispensável e essas características tornam a mandioca um produto cujo cultivo se harmoniza aos cuidados com o meio ambiente.

O'hair (1998) cita que a resistência da mandioca às condições climáticas é determinante na sua utilização como reserva alimentar nas regiões de grande estiagem, como é o caso do Nordeste brasileiro. Segundo o autor, a mandioca tem importância significativa em países tropicais de baixa renda, por constituir grande fonte de carboidrato com baixos custos de produção. Cardoso (2003) também aponta a mandioca como uma das principais fontes de carboidratos para uma parte significativa da população de baixa renda no Brasil.

Segundo Cereda (2001), e ilustrado na Tabela 2, a composição da mandioca varia com a espécie, idade e condições de cultivo. Por apresentar elevado teor de amido e baixos teores de gorduras, proteínas e cinzas, a mandioca é matéria-prima para obtenção, por hidrólise, de derivados.

Segundo Dallaqua e Coral (2002), a mandioca apresenta-se como um arbusto de 2 a 3 metros de altura, de raiz tuberosa, com alto valor como alimento quando cozida, dependendo da variedade, mas de alto valor tóxico quando crua. As raízes são utilizadas na alimentação humana, na forma de farinha, fécula ou polvilho, tapioca, ou ainda frita ou cozida (CEREDA, 1994).

Tabela 2 - Composição química da raiz de mandioca, em massa seca

Massa seca	40,60 %
Amido	82,50 %
Açúcares redutores	0,20 %
Proteínas	2,60 %
Matéria graxa	0,30 %
Cinzas	2,40 %
Fibra	2,70 %

Fonte: Cereda, 2001.

A mandioca pode ser dividida de acordo com a toxicidade, referente ao teor de glicosídeos cianogênicos presentes nos tecidos da planta, que, ao se hidrolisarem por ação enzimática, desdobram-se em ácido cianídrico. Dessa forma, são denominadas mansas ou não tóxicas as variedades de mandioca que apresentam até 100 mg de HCN por kg de polpa de raiz fresca, enquanto as variedades com concentrações acima desse valor são denominadas bravas (PANTAROTO; CEREDA, 2000; BORGES et al., 2002; SCHUOFF, 2005). Segundo SEBRAE (2008), outra forma de se classificar os cultivares de mandioca é de acordo com a duração do ciclo entre o plantio e a colheita. As três categorias usualmente conhecidas são as precoces (de 10 a 14 meses), as semiprecoces (de 14 a 16 meses) e as tardias (mais de 18 meses).

A mandioca se disseminou rapidamente após sua inserção no continente africano, que hoje detém grande parte da produção mundial. Dos vinte maiores produtores mundiais, onze se encontram naquele continente, seguido da Ásia (predominantemente o sudeste), com 6 países. A América do Sul tem três representantes: Brasil, Paraguai e Colômbia, nesta ordem (SEBRAE, 2008).

Os dados da Tabela 3, apresentados pela FAO, mostram que a África é responsável por 55,91% da produção mundial; a Ásia, por 30,40%; e os principais países produtores da América Latina, somam 11,56%. Nigéria, Brasil e Tailândia são os países que dominam a produção mundial.

Tabela 3 - A produção mundial de mandioca

	2008	2009	2010	2011
	Milhões de toneladas			
Mundo	232,008	235,450	236,707	252,204
África	121,155	120,890	127,704	140,966
Nigéria	43,410	36,822	42,533	52,404
Congo, Dem. Rep.	15,004	15,055	15,050	15,569
Gana	10,218	12,231	13,504	14,241
Angola	9,730	12,828	13,859	14,334
Moçambique	6,039	5,670	5,700	6,267
Tanzânia	5,199	5,916	4,548	4,647
Uganda	4,973	5,179	5,282	4,753
América Latina				
Brasil	26,541	24,404	24,496	25,442
Paraguai	2,219	2,610	2,624	2,454
Colômbia	1,804	2,202	2,364	2,264
Ásia	76,046	81,345	75,079	76,681
Tailândia	25,156	30,088	22,005	21,912
Indonésia	21,593	22,039	23,918	24,010
Vietnã	9,310	8,531	8,596	9,876
Índia	9,056	9,623	8,060	8,076
China Continental	4,409	4,506	4,694	4,515
Camboja	3,676	3,497	4,247	4,368
Filipinas	1,942	2,044	2,101	2,210

Fonte: FAO, 2012.

A Tabela 4 apresenta um confronto dos dados de produção e rendimento médio nas safras de 2011 e 2012, bem como estimativas para 2013, divulgados pelo IBGE (2012; 2013).

Tabela 4 - Produção e rendimento médio - confronto das safras de 2011, 2012 e das estimativas para 2013

GRANDES REGIÕES E UNIDADES DA FEDERAÇÃO	SAFRA 2011		SAFRA 2012		SAFRA 2013		PARTICIPAÇÃO (%)		
	PRODUÇÃO (t)	REND. MÉDIO (kg/ha)	PRODUÇÃO (t)	REND. MÉDIO (kg/ha)	PRODUÇÃO (t)	REND. MÉDIO (kg/ha)	SAFRA 2011	SAFRA 2012	SAFRA 2013
TOTAL	25.329.667	14.520	24.313.883	13.356	25.666.901	14.566	100,0	100,0	100,0
NORTE	7.718.264	15.508	7.779.696	15.708	7.630.999	15.328	30,5	32,0	29,7
RONDÔNIA	513.515	16.997	588.307	17.897	428.430	16.933	2,0	2,4	1,7
ACRE	971.192	19.652	897.160	19.982	938.223	19.588	3,8	3,7	3,7
AMAZONAS	1.058.642	11.819	955.734	11.962	1.090.800	12.000	4,2	3,9	4,2
RORAIMA	77.192	13.309	77.192	13.309	77.192	13.309	0,3	0,3	0,3
PARÁ	4.644.492	15.807	4.808.743	15.957	4.714.868	15.557	18,3	19,8	18,4
AMAPÁ	137.141	12.183	149.355	11.762	155.000	12.400	0,5	0,6	0,6
TOCANTINS	316.090	17.927	303.205	17.082	226.486	18.293	1,2	1,2	0,9
NORDESTE	7.904.634	10.718	6.643.769	8.237	8.163.667	10.873	31,2	27,3	31,8
MARANHÃO	1.780.279	8.577	1.529.579	7.782	1.636.671	8.508	7,0	6,3	6,4
PIAUÍ	511.424	10.944	319.629	5.254	446.570	10.981	2,0	1,3	1,7
CEARÁ	836.606	9.833	938.246	5.259	828.177	10.061	3,3	3,9	3,2
RIO GRANDE DO NORTE	305.168	11.868	236.855	8.095	330.944	11.329	1,2	1,0	1,3
PARAÍBA	219.756	9.333	158.482	7.698	205.704	9.987	0,9	0,7	0,8
PERNAMBUCO	514.329	11.197	446.870	9.191	462.321	8.917	2,0	1,8	1,8
ALAGOAS	275.892	15.559	269.947	15.412	259.724	14.829	1,1	1,1	1,0
SERGIPE	483.990	14.925	450.486	14.659	460.495	14.855	1,9	1,9	1,8
BAHIA	2.977.190	11.778	2.293.675	10.236	3.533.061	12.384	11,8	9,4	13,8
SUDESTE	2.448.044	17.009	2.795.493	17.880	3.023.475	18.354	9,7	11,5	11,8
MINAS GERAIS	816.320	14.266	820.604	13.789	815.958	13.919	3,2	3,4	3,2
ESPÍRITO SANTO	190.102	16.801	206.929	17.665	189.804	17.923	0,8	0,9	0,7
RIO DE JANEIRO	229.216	15.473	324.449	16.501	300.621	15.306	0,9	1,3	1,2
SÃO PAULO	1.212.406	20.013	1.443.511	22.052	1.717.092	22.631	4,8	5,9	6,7
SUL	5.990.534	20.505	5.784.205	20.113	5.586.136	20.195	23,7	23,8	21,8
PARANÁ	4.179.245	22.681	4.062.905	22.621	3.893.443	22.165	16,5	16,7	15,2
SANTA CATARINA	506.280	18.425	530.098	18.232	517.654	18.434	2,0	2,2	2,0
RIO GRANDE DO SUL	1.305.009	16.230	1.191.202	15.097	1.175.039	16.126	5,2	4,9	4,6
CENTRO OESTE	1.268.191	17.333	1.310.720	17.571	1.262.624	17.507	5,0	5,4	4,9
MATO GROSSO DO SUL	630.286	20.775	634.529	20.534	635.500	20.500	2,5	2,6	2,5
MATO GROSSO	355.896	14.198	349.917	14.646	353.321	14.597	1,4	1,4	1,4
GOIÁS	271.929	15.958	299.602	16.494	263.121	16.239	1,1	1,2	1,0
DISTRITO FEDERAL	10.080	14.000	26.672	16.293	10.682	14.982	0,0	0,1	0,0

Fonte: IBGE, 2012-2013.

A produção de mandioca no Brasil teve uma redução de 2011 para 2012, porém estima-se um aumento de produção em 2013 que supera a produção de 2012. O rendimento médio no Brasil tem se mantido em torno de 13,36 a 14,57 t/ha, porém apresenta bastante variação com relação às diferentes regiões do país. As regiões Norte e Nordeste lideram a produção nacional, apresentando participação de 32,0 e 27,3% respectivamente em 2012. Em seguida estão as regiões Sul e Sudeste, com participação de 23,8 e 11,5%, respectivamente, e, por último, aparece a região Centro Oeste, com 5,4% de participação na produção nacional.

O estado do Pará lidera a produção na região Norte, com 4,8 milhões de toneladas produzidas em 2012 e um rendimento médio de 15,96 t/ha. São Paulo lidera a produção na região Sudeste, com 1,4 milhões de toneladas e um rendimento médio de 22,0 t/ha. O Estado do Paraná lidera a produção na região Sul, com 4,1 milhões de toneladas e maior rendimento médio do país, 22,6 t/ha. No Centro Oeste, a liderança fica por conta do Estado do Mato Grosso do Sul, com uma produção de 639.529 toneladas e um rendimento médio de 20,5 t/ha. Já na região Nordeste, Bahia e Maranhão se destacam com uma produção de 2,3 e 1,5 milhões de toneladas e rendimento de 10,2 e 7,8 t/ha, respectivamente, no ano de 2012. Alagoas apresenta uma produção de 269.947 toneladas e um rendimento de 15,4 t/ha, superior aos outros Estados da região e da média nacional.

Em Alagoas, a mandioca é a segunda maior produção agrícola, sendo fundamental para os programas de agricultura familiar SEBRAE (2006a). Segundo a CONAB (2004), a cultura de mandioca em Alagoas é concorrente com a cultura do fumo quanto à área plantada, tornando o preço do produto fator determinante na quantidade de área destinada a essas culturas. Dessa forma, a maior área será destinada à cultura que apresentar preço mais compensador para os agricultores. Segundo o autor, todo o Estado mantém plantação de mandioca, porém a maior concentração encontra-se na região do Agreste e de Palmeira dos Índios, abrangendo os municípios de Arapiraca, Lagoa da Canoa, Girau do Ponciano, Coité do Nóia, Taquarema, Feira Grande, Campo Grande, Limoeiro de Anádia, Craíbas, São Sebastião, Estrela de Alagoas, Igaci e Belém.

A mandioca apresenta bom rendimento médio quando comparada com outras culturas ricas em açúcar e que podem ser utilizadas para produção de etanol (Tabela 5).

Tabela 5 - Área plantada, quantidade produzida e rendimento médio de algumas culturas

Produto	Área Plantada (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (kg/ha)
Batata doce	43.879	544.820	12.427
Cana de açúcar	9.424.615	675.014.649	71.623
Mandioca	1.820.421	24.313.883	13.356
Milho (em grão)	14.222.873	71.490.641	5.026

Fonte: IBGE, 2011- 2013.

2.2.3 Farinha de Mandioca

EMBRAPA (2003) destaca que a mandioca tem uma grande variedade de uso industrial, sendo mais importantes a farinha e a fécula. Segundo EMBRAPA (2012), o processamento industrial da mandioca, no Brasil, concentra-se na produção de farinha, com cerca de 80%, na extração de fécula, em torno de 3%, sendo o restante utilizado na alimentação animal. Ainda segundo EMBRAPA (2012), a farinha é o principal derivado da mandioca no Brasil, dada à simplicidade do seu processo produtivo (ainda semelhante aos métodos herdados dos índios, em muitos casos) e à ampla aceitação no mercado.

De acordo com Cereda (2001), o Brasil é o único país da América Latina a consumir este produto, uma vez que o mercado asiático o desconhece e o mercado africano possui pouco poder de compra e produção muito significativa para representar uma oportunidade comercial aos brasileiros. Assim, segundo SEBRAE (2008), o mercado da farinha fica restrito ao consumo nacional, mais frequentemente, local.

A fabricação de farinha é uma atividade centenária no Nordeste. No Brasil, vem desde o período colonial, quando o cultivo de mandioca ainda era praticado a partir de pequenas roças que supriam a alimentação dos trabalhadores da cana-de-açúcar. A sua produção é presença dominante entre empresas de micro e pequeno porte. Apesar da existência variada de subprodutos, a farinha de mandioca foi sempre considerada um “bem” inferior (SEBRAE, 2006a).

Segundo EMBRAPA (2012), o maior consumo de farinha, por domicílio, é observado na Região Norte (34,189 kg/hab./ano), sendo Pará (43,988 kg/hab./ano), Amazonas (43,778 kg/hab./ano), Amapá (32,376 kg/hab./ano) e Bahia (25,449 kg/hab./ano) os Estados com os maiores índices de consumo de farinha.

A farinha tem essencialmente uso alimentar e, além dos diversos tipos regionais, que não modificam as características originais do produto, encontra-se em duas formas: farinha não-temperada, que se destina à alimentação básica e é consumida principalmente nas classes de renda baixa da população; e farinha temperada (farofa), de mercado mais restrito, mas de maior valor agregado. Este último tipo se destina às classes de renda média e alta da população (EMBRAPA, 2003).

Segundo SEBRAE (2006a), a produção de farinha tem destaque na região conhecida como APL (Arranjo Produtivo Local) Mandioca do Agreste Alagoano, sendo responsável pela subsistência de mais de 25 mil famílias, cujas economias domésticas estão ligadas a toda a cadeia produtiva, em mais de 600 casas de farinha instaladas na região e mais de 20 mil hectares de plantio da raiz.

De acordo com SEBRAE (2006b), apesar da farinha de mandioca ser tradição na mesa do brasileiro, só recentemente passou a ser enquadrada como alimento e a partir de então os processos de fabricação assim como as dependências industriais devem atender às exigências das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Dependendo da tecnologia de fabricação utilizada, pode pertencer a um entre três grupos: a farinha seca, a d'água e a mista. Cada grupo é, por sua vez, dividido em subgrupos de acordo com a sua granulação, em classes, em função da

coloração e em tipos pelas variações na qualidade do processamento (FOLEGATTI; MATSUURA, 2007). Segundo SEBRAE (2008), a predominância do tipo consumido varia de acordo com as preferências locais de cada região do país.

De modo geral, o processamento de cada tipo de farinha se assemelha e a Figura 3 apresenta o fluxograma genérico do processo. A seguir descrevem-se as principais etapas, assim como os equipamentos envolvidos no processamento da mandioca para produção de farinha, segundo EMBRAPA (2003), SEBRAE, (2006a), Costa (2010) e SEBRAE (2006b).

Figura 3 - Fluxograma do processamento da mandioca para produção de farinha



Fonte: Autor, 2013 - Adaptado de SEBRAE, 2006a e SEBRAE, 2006b.

Ao receber as raízes (Figura 4), cuidados com a pesagem e o armazenamento devem ser tomados. Controlar a entrada da matéria-prima é fundamental para que os custos do processo sejam otimizados e bem aproveitados,

assim como o adequado armazenamento evita perdas por apodrecimento ou umidade em excesso.

Figura 4 - Caminhão de transporte de raízes



Fonte: SEBRAE, 2006b.

O descascamento das raízes pode ser feito mecanicamente, através do lavador-descascador (Figura 5), ou manualmente (Figura 6). Neste processo, os cuidados com a higiene são fundamentais, a fim de se evitar que as bactérias iniciem seu processo de proliferação, sendo importante que as raízes, após o descasque, sejam encaminhadas diretamente para lavagem e que as cascas não fiquem acumuladas na área de trabalho, evitando o aparecimento de moscas.

Figura 5 - Equipamento de lavagem e descasque de raízes



Fonte: SEBRAE, 2006b.

Figura 6 - Descasque manual na atualidade



Fonte: SEBRAE, 2006b.

Após o descascamento, devido às sujeiras vindas do campo, juntamente com às geradas pelo manuseio, faz-se necessária uma lavagem acompanhada de molho em água clorada. É de fundamental importância que estes primeiros processos tenham início tão logo as raízes sejam colhidas, uma vez que sua deterioração começa entre 24 e 48 horas após serem arrancadas do solo.

A trituração é composta de uma sequência de raladores que irão transformar as raízes em uma massa, como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 - Triturador de raízes em operação



Fonte: SEBRAE, 2006b.

A ralação também pode ser feita em cilindro provido de eixo central com serrinhas, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Ralador de mandioca



Fonte: Costa, 2010.

Essa massa deve ser armazenada, temporariamente, em um tanque de alvenaria, azulejado, evitando que resíduos fiquem aderidos às paredes do tanque e contaminem a massa.

Depois de ralada, a massa deve ser prensada para diminuir a umidade proveniente da manipueira que ainda restou. Além disso, a massa em blocos evita maior exposição ao ar, diminuindo a ocorrência da fermentação e, por este motivo, deve-se ajustar um menor intervalo entre esta etapa e a próxima.

A prensagem é realizada em prensas manuais de parafuso ou em prensas hidráulicas, como mostram as Figuras 9 e 10, respectivamente. Isto economiza tempo e combustível na torragem e possibilita uma torração sem formação excessiva de grumos.

Figura 9 - Prensa hidráulica em operação



Fonte: SEBRAE, 2006b.

Figura 10 - Prensagem da mandioca ralada



Fonte: Costa, 2010.

A próxima etapa, o peneiramento, tem por objetivo esfarelar a massa prensada, auxiliando a torração e garantindo a produção de uma farinha mais fina. Este processo pode ser mecânico ou manual, como apresentado na Figura 11. No caso de ser mecânico, utiliza-se uma peneira vibratória com motor elétrico, melhor opção visto que melhora a eficiência do processo, a rentabilidade da matéria-prima e a otimização dos custos, além de elevar a qualidade do produto. No caso de ser manual, o peneiramento é feito pela passagem repetida de um rodo sobre a massa prensada colocada sobre a peneira.

Figura 11 - Peneira de massa prensada em operação



Fonte: SEBRAE, 2006b.

Após o esfarelamento e peneiramento, a massa deve ser levada ao forno para secagem, o que elimina a fração restante de manipueira, que dá um sabor amargo à farinha e é eliminado, somente na torração final. Esta secagem também contribui para o clareamento. A Figura 12 ilustra um forno utilizado para secagem.

Este é o processo-chave da produção da farinha. Há vários tipos de fornos para este processo, os quais modificam o resultado final e a produtividade da casa de farinha. Na torração é que se determina a cor, o sabor e o tempo de conservação do produto. A umidade final da farinha deve ser inferior a 14%.

Figura 12 - Forno de secagem



Fonte: Costa, 2010.

No peneiramento com a farinha já torrada há a separação de acordo com sua granulação (mais grossa ou mais fina) e as partículas excessivamente grandes podem ser moídas novamente. A malha da peneira será determinada de acordo com o tamanho do grão que se quer obter.

A etapa do resfriamento pode ser realizada em “freezer”, geladeira ou por meio de equipamento apropriado para tal. Pode, também, ser feita em temperatura ambiente, porém disposto em finas camadas e revolvido periodicamente.

A farinha poderá ser acondicionada em sacos de rafia com capacidade para 50 kg ou em pacotes de 1 kg, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Pesagem e envase da farinha de mandioca



Fonte: SEBRAE, 2006a.

2.3 Enzimas

Enzimas são substâncias orgânicas específicas, formadas por longas cadeias de moléculas pequenas, chamadas de aminoácidos, que atuam como catalisadores biológicos no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003 *apud* COSTA, 2010). Furigo Júnior (2001) define enzima como um tipo de proteína com atividade catalítica, encontradas na natureza e em todos os seres vivos, cuja função é viabilizar a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos.

Segundo Laidler (1954), as enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação. São denominadas adicionando a terminação *ase* ao nome do substrato com o qual realizam reações. Sendo assim, a enzima que controla a decomposição da uréia recebe o nome de urease; aquelas que controlam a hidrólise de proteínas denominam-se proteases assim como as que hidrolisam o amido são chamadas de amilases. Algumas enzimas como as proteases tripsina e pepsina, conservaram os nomes utilizados antes que se adotasse esta nomenclatura.

De acordo com Harger et al. (1982) *apud* Costa (2010), a palavra amilase (E.C. 3.2.1) indica a ação enzimática sobre o amido, que contém dois polissacarídeos: amilose (15 a 20%) e amilopectina (80 a 85%).

As amilases são hidrolases capazes de degradar o amido, e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. São amplamente distribuídas na natureza, encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Estão entre as enzimas mais importantes empregadas na indústria, devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais (GUPTA et al., 2003).

Segundo Reed (1975) as amilases podem ser divididas em três grupos: α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases) e glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Gupta et al. (2003) citam que, atualmente, são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido. A α -amilase (E.C. 3.2.1.1) é a endoamilase mais conhecida. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1 $\rightarrow$ 4, como a β -amilase (E.C. 3.2.1.2) ou ambas as ligações α -1 $\rightarrow$ 4 e α -1 $\rightarrow$ 6, como amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) e glicosidase (E.C. 3.2.1.20). Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase e a α -amilase maltogênica (glicano 1,4- α -glicanohidrolase).

A Figura 14, apresentada por Costa (1996), mostra um esquema para identificar e classificar as enzimas amilolíticas. A Figura 15 mostra o mecanismo de ação das classes de enzimas amilolíticas sobre a molécula de amido (PRETORIUS et al., 1991).

Segundo Lacerda (2006), a amilose sofre ação da α -amilase em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose. Reed (1975) considera a faixa ótima para a atividade enzimática a temperatura de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte. Segundo o autor, a atividade aumenta consideravelmente de 0 a 40°C. Entretanto, as amilases bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima ao redor de 70°C.

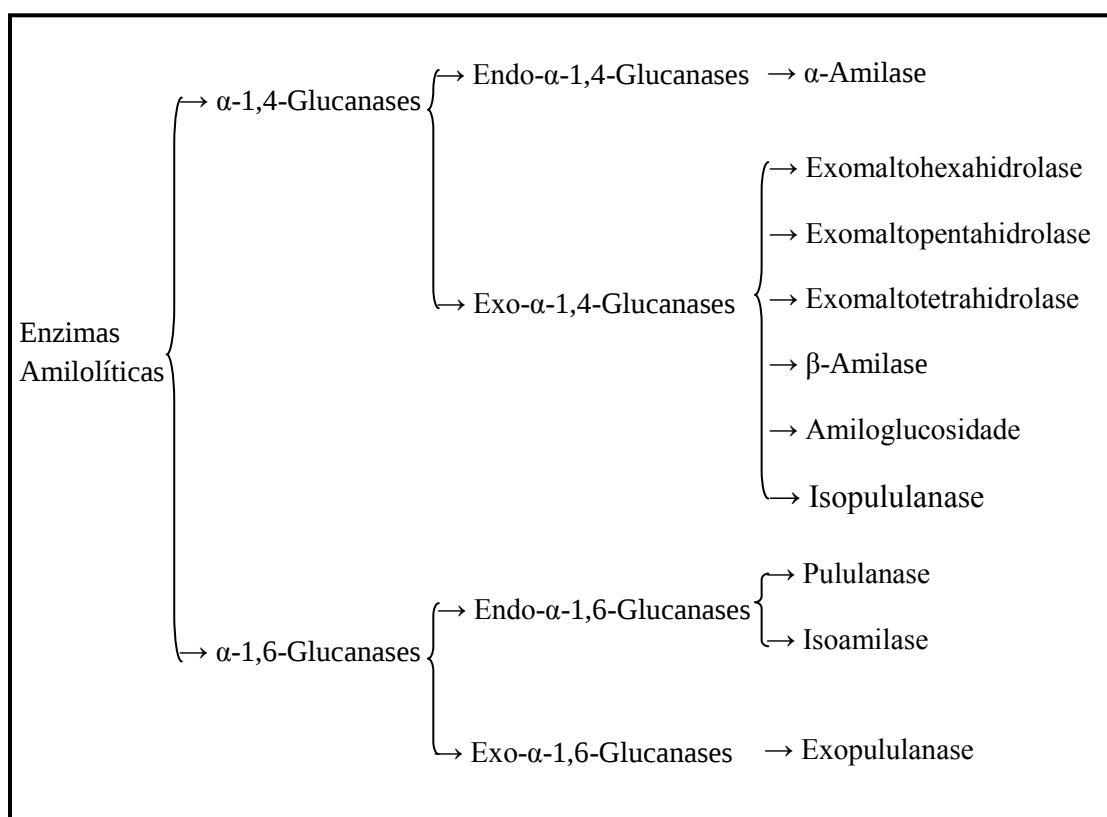
Estas enzimas são produzidas por uma variedade muito grande de organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e actinomicetes, entretanto as enzimas derivadas de fungos e bactérias são dominantes, destacando-se entre os principais produtores de α -amilases os gêneros *Aspergillus* e *Bacillus* (PANDEY et al., 2000).

β -Amilases (1,4- α -D-glucano maltohidrolase, E.C. 3.2.1.2) são exoenzimas que clivam ligações glicosídicas, em seqüência, a partir de extremidades não-redutoras da amilose, amilopectina e glicogênio, liberando somente resíduos de maltose na forma β -anomérica, aumentando rapidamente o poder redutor da solução inicial. São denominadas também de amilases sacarificantes, uma vez que as

maltoses resultantes são facilmente fermentáveis. A parte não degradada do substrato ramificado é denominada de β -dextrina limite. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 e 50°C (SAKANO et al., 1982).

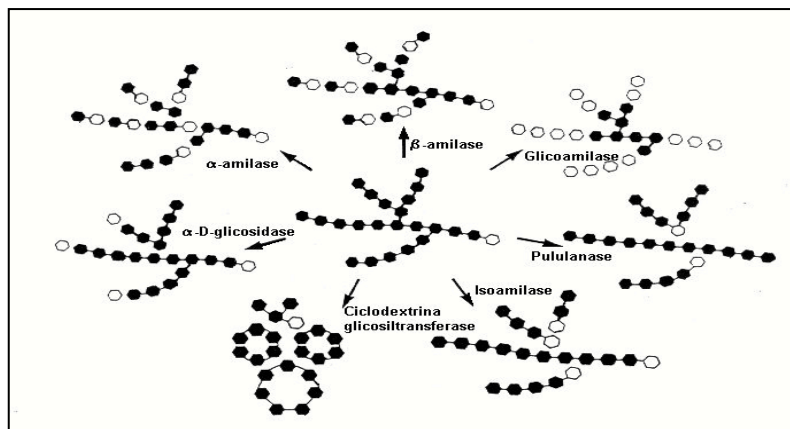
Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. As principais aplicações das enzimas extracelulares que degradam o amido consistem na conversão do amido em monossacarídeos como a glicose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas. São empregadas na obtenção de açúcares fermentescíveis utilizados nas indústrias cervejeiras, na produção de bebidas alcoólicas e na modificação de farinhas empregadas em panificação (WARD, 1989; SILVA; PERALTA, 2000).

Figura 14 - Classificação das enzimas amilolíticas



Fonte: Nigam; Singh, 1995.

Figura 15 - Classes de enzimas amilolíticas e mecanismo de ação sobre a molécula de amido



Fonte: Pretorius et al., 1991.

As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, devendo-se, principalmente, a vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão. Ressalta-se, ainda, que as reações enzimáticas acontecem, geralmente, em condições brandas de temperatura e de pH, o que significa, para as indústrias, redução nos custos operacionais (FERNANDES et al., 2007). Apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

Resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de cascas, farinhas, caroços e outros. Esses resíduos são fontes baratas, utilizadas como substrato ou fonte de carbono no processo fermentativo para obtenção de compostos de interesse industrial como as enzimas. Os processos envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (COELHO et al., 2001). Segundo Pandey et. al.(2005), o mercado mundial de enzimas industriais movimenta valores da ordem de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares e estima-se que a comercialização de enzimas amilolíticas movimente aproximadamente 225 milhões de dólares.

2.4 Fermentação Etanólica

A fermentação etanólica apresenta importância indiscutível no contexto do desenvolvimento nacional e aplicação de métodos biotecnológicos em escala comercial (DEMIATE et al., 1997).

Segundo Ostrowski (2006), a fermentação etanólica é um processo bioquímico que ocorre no citoplasma da levedura etanólica, responsável pela transformação de açúcar em etanol.

Cereda (2001) classifica as formas de condução da fermentação etanólica em processos descontínuos (batelada), batelada alimentada e contínuos. O autor defende o uso de processos descontínuos e contínuos com recirculação de células, para o caso particular da produção industrial de etanol, pois a reciclagem do fermento aumenta a concentração de levedura no mosto em fermentação, aumentando a produtividade do processo.

Os processos de fermentação etanólica mais utilizados no Brasil são a batelada alimentada e o contínuo. Batelada alimentada é o processo de fermentação mais utilizado nas destilarias do Brasil, também chamado de *Melle-Boinot*, cuja característica principal é o reaproveitamento das leveduras. No processo contínuo, o meio nutriente mais o inóculo são injetados de forma contínua em reatores, com a saída da mesma quantidade de meio fermentado (ABUD, 1997 *apud* OLIVEIRA, 2001).

2.4.1 Agentes de Fermentação Etanólica

As leveduras, de um modo geral, são capazes de desdobrar a glicose, com produção de etanol e gás carbônico. Entretanto, o número de espécies envolvidas na fermentação industrial é bastante reduzido. A levedura empregada na fermentação depende de várias circunstâncias, entre as quais o substrato ou a matéria prima utilizada, o teor de etanol desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, e outros (OSTROWISKI, 2006).

Segundo Ostrowski (2006), as espécies mais importantes para produção de etanol combustível são as leveduras:

- a) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, utilizada principalmente na produção de etanol comum, aguardente, cerveja e outras bebidas e na panificação;
- b) *S. ellipsoideus* Hansen (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Dekker) utilizadas na produção de vinho de uva;
- c) *S. calbergensis*, para a produção de cerveja.

2.4.2 Fatores que Afetam a Fermentação Etanólica

Entre vários fatores ambientais que afetam a fermentação etanólica do hidrolisado de amido, Ostrowski (2006) cita:

- a) Temperatura: variável de acordo com o tipo e finalidade do processo, sendo o ponto ótimo para a produção de etanol, aguardente, vinho e outros produtos na faixa de 26 a 32°C e, para a cerveja, entre 6 e 20°C;
- b) pH do mosto: também variável, entre 4,0 e 4,5 para a produção de etanol e entre 4,0 e 6,0 para a cerveja. O pH baixo inibe o desenvolvimento de bactérias contaminantes, sem prejudicar o desenvolvimento da levedura;
- c) Concentração de matéria prima: nos processos industriais ela é variável de acordo com a finalidade do processo, situando-se entre 18 e 20% no melaço, para a produção de etanol, entre 6 e 9% para a produção de cerveja e entre 22 e 24% no suco de uva para obtenção de vinho.

A fermentação etanólica com açúcares em concentrações excedentes a 27 % (p/v) é lenta e poucos sacarídeos são convertidos em açúcares (BAFRNCOVÁ et al., 1999 *apud* OLIVEIRA, 2011). Altas concentrações de açúcares no mosto fermentativo são responsáveis pela parada ou diminuição da fermentação devido ao aumento da pressão osmótica e

da alta toxicidade do etanol para as células de leveduras (BISSON; BUTZKE, 2000; MALACRINÒ et al., 2005);

- d) Teor de etanol do produto: o aumento do teor de etanol do mosto em fermentação inibe o desenvolvimento da própria levedura. Deve-se ter em conta que o teor de etanol depende da concentração inicial de açúcares, a qual, por sua vez, varia de acordo com o objetivo da fermentação.

O etanol pode se tornar tóxico para a célula de levedura (GHOOSE; TYAGI, 1979), sendo a tolerância à altas concentrações de etanol dependente da linhagem. Na maioria das leveduras, a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10% (p/v), que proporciona uma produção de etanol de no máximo 20% (p/v) (OLIVEIRA, 2011);

- e) Elementos minerais: certos tipos de matérias-primas requerem a adição de substâncias minerais para suprir as necessidades da levedura em certos elementos, principalmente P e K, geralmente adicionados sob a forma de K_2HPO_4 .

2.4.3 Importância dos Nutrientes para a Fermentação Etanólica

Na fermentação etanólica, o crescimento celular está intimamente relacionado com a formação do produto, que é o etanol. Desta forma, tanto o crescimento da levedura como a formação do etanol são influenciados pelas condições que o meio oferece. Então, para suprir as exigências das leveduras, alguns macronutrientes e/ou micronutrientes são adicionados ao mosto, a fim de complementar as deficiências do meio quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras, para a máxima transformação dos açúcares (SANTOS, 2008).

As leveduras são microrganismos saprófitas, que exigem uma fonte de carbono elaborada, glicose ou outro açúcar, que fornece a energia química através do esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como

tiamina e ácido pantatênico, também são exigidas. O meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA et al., 2001).

Os micronutrientes (enxofre, magnésio, manganês, zinco, cobre, cobalto, dentre outros) têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas. Zinco, cobre e manganês são muito interessantes devido ao efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Segundo Aiba et al. (1973), fósforo, potássio, enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de microrganismos. Estes e outros elementos presentes em quantidades significativas devem ser suplementados ao meio de cultura.

Lima et al. (2001) apresentam as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação etanólica (Tabela 6). Segundo os autores, tais nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessária uma complementação. Entretanto, podem ocorrer tanto teores inadequados e deficiência de alguns nutrientes quanto concentrações excessivas de outros.

Tabela 6 - Concentração de nutrientes minerais no mosto para adequada fermentação etanólica

Nutriente Mineral	Concentração (mg/L)	Nutriente Mineral	Concentração (mg/L)
NH_4^+	40 – 5900	Co^{++}	3,5
P	62 – 560	Co^{+++}	10
K^+	700 – 800	Zn^{++}	0,5 – 10
Ca^{++}	120	Cu^{++}	7
Mg^{++}	70 – 200	Mn^{++}	10 – 33
SO_4^-	7 – 280	Mn^{+++}	10 (10 – 80)
Na^+	200	Fe^{++}	0,2

Fontes: Amorim, 1977; Lima, 1953; Lima, 1962.

Os nutrientes exercem funções importantes e diferenciadas no metabolismo celular. Fósforo é essencial para o metabolismo energético e síntese de ácidos nucléicos, tendo importância na transformação do açúcar em etanol e na produção de ATP, tanto na glicólise quanto na cadeia respiratória. Potássio atua como ativador em uma série de reações da glicólise e em outros passos do metabolismo. Magnésio desempenha um papel importante no crescimento das leveduras como cofator de muitas reações metabólicas. Cobre e ferro são necessários em pequenas quantidades, na fase de multiplicação e crescimento da levedura. Zinco, manganês e cobalto atuam como ativadores enzimáticos na glicólise. Cálcio, embora não seja aparentemente necessário para o crescimento de células de leveduras, estimula a fermentação (AMORIM, 1977; SUOM ALAINE; OURA, 1971 *apud* VASCONCELOS, 1987; PEREIRA, 2007; SILVA, 2007).

Dragone et al. (2004) investigaram diferentes fatores de fermentação de xarope de maltose no aumento da produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae*, dentre eles a suplementação do mosto com nutrientes como extrato de levedura e ergosterol, e concluíram que a produção de etanol aumenta com a adição dos nutrientes, mesmo sem avaliar a concentração desses nutrientes.

2.4.4 Parâmetros Cinéticos Importantes na Fermentação Etanólica

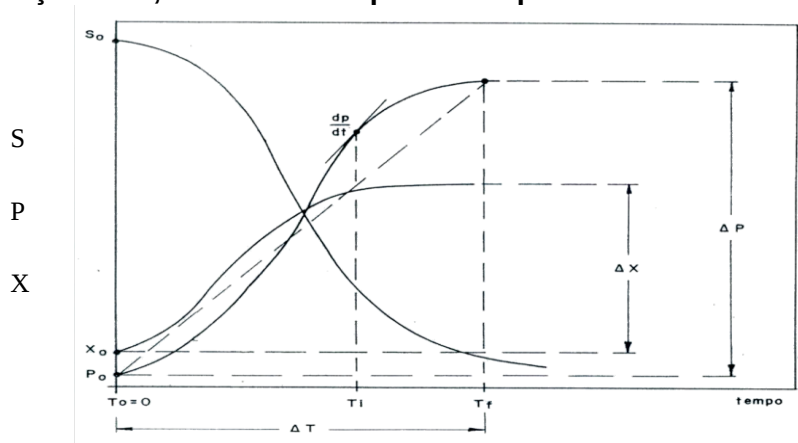
Em uma fermentação ocorrem muitas transformações, células crescem, se reproduzem e morrem, substâncias diversas existentes no meio são consumidas pelos microorganismos e produtos de metabolismo são lançados no meio em que os microorganismos atuam. No caso da fermentação etanólica, os parâmetros mais medidos para acompanhamento cinético são (COPERSUCAR, 1987):

- A variação da concentração de células com o tempo;
- A variação da concentração de substrato com o tempo;
- A variação da concentração de etanol formado com o tempo;
- Eventualmente, a variação de outros nutrientes ou produtos (fonte de nitrogênio, CO₂, etc.) com o tempo.

Segundo Gretschmann (2009), o estudo do processo fermentativo consiste em avaliar a evolução dos valores de concentração de tais parâmetros do meio de cultivo em função do tempo de fermentação. Segundo o autor, os valores experimentais desses parâmetros, permitem que sejam traçadas curvas de ajuste que descrevem os mesmos.

A Figura 16 apresentada por COPERSUCAR (1987) representa o comportamento de um processo fermentativo em batelada simples, onde ocorre consumo de substrato com simultânea formação de produto e crescimento celular. Segundo os autores, a partir destas curvas é possível determinar as velocidades médias de transformações num período de tempo (Δt). Considera-se no gráfico, as concentrações de substrato (S), concentração de produto (P) e concentração de microorganismos (X) presente no meio em um instante t.

Figura 16 - Variação de S, X e P com tempo em um processo fermentativo descontínuo



Fonte: COPERSUCAR, 1987.

De acordo com Lima et al. (2001), a fermentação etanólica pode ser dividida em fases distintas, embora não se possam estabelecer, com rigidez, os limites de separação entre elas. Segundo o autor, pode-se distinguir numa fermentação etanólica uma fase preliminar, uma fase principal ou tumultuosa e uma fase complementar. Na primeira fase, também denominada fase preliminar, *lag-fase* ou *fase lag*, ocorre grande multiplicação celular, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono. Nesta etapa garante-se a produção de grande quantidade de células.

Na segunda fase, também denominada fase tumultuosa, ocorre o desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, devido ao grande número de células presentes no meio para desdobrar os açúcares fermentescíveis do mosto. Esta é a fase de maior tempo de duração. A temperatura eleva-se rapidamente, a densidade do mosto reduz-se e elevam-se a porcentagem de etanol e a acidez. A elevação da temperatura deve ser corrigida com um sistema de refrigeração. Já na fase complementar observa-se a diminuição da intensidade do desprendimento do dióxido de carbono, por menor agitação do meio e diminuição de temperatura, até encerramento da fermentação.

No estudo da cinética de processos fermentativos, é interessante que seja examinada a maneira pela qual as curvas representativas das variações das concentrações de substrato e de produto relacionam-se entre si. Nesse sentido podem ser observadas (COPERSUCAR, 1987):

- Fermentações nas quais a formação de produto está diretamente relacionada à utilização do substrato. Exemplo: fermentação etanólica;
- Fermentações nas quais a formação de produto está indiretamente relacionada à utilização do substrato. Exemplo: fermentação para produção de ácido cítrico;
- Fermentações nas quais a formação de produto não está, aparentemente, associada à utilização do substrato. Exemplo: fermentação penicilínica.

Segundo Daré (2009), o estudo da cinética dos processos fermentativos exige o conhecimento e a utilização de parâmetros que possibilitem a análise da produção de células e produção da substância desejada, como o etanol. Segundo o autor, entre os parâmetros encontram-se a velocidade específica de crescimento celular (μ_x ou simplesmente μ), a velocidade específica de consumo do substrato (μ_s) e a velocidade específica de formação de produto (μ_p).

De acordo com COPERSUCAR (1987), os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de substrato em produto ($Y_{P/S}$), também são muito importantes no

estudo de processos fermentativos, visto que a partir destes parâmetros é possível determinar o rendimento da fermentação.

2.5 Considerações sobre Produção de Etanol a partir de Matéria-Prima Amilácea

A necessidade de se reduzir as emissões de dióxido de carbono resultante dos combustíveis fósseis, bem como as preocupações referentes à escassez destes, tem intensificado a busca por novas fontes de energia limpa. No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para a produção de etanol. Ainda assim, outras culturas apresentaram-se rentáveis para esta finalidade, dentre as quais a mandioca (RIZATO; FELIPE, 2009).

A produção de etanol de material amiláceo não é novidade no Brasil. O presidente da Câmara Setorial da Mandioca do Estado de São Paulo, José Reynaldo Bastos da Silva, revela que a produção de etanol a partir da mandioca já ocorre desde a implantação do *Proálcool*, em 1975, quando era considerada uma alternativa viável. Naquela época, seis usinas foram instaladas no Brasil para a produção de etanol a partir da mandioca. Entre 1978 e 1983, a Petrobrás produziu o combustível em uma unidade do Maranhão, a única que conseguiu, com certa rotina, por se tratar de região relativamente vocacionada a esta cultura, enquanto as demais usinas foram construídas em regiões pouco tradicionais de produção e industrialização econômica da mandioca, tornando a produção inviável. Também, porque, àquela época, inexistia uma tecnologia eficiente para o cultivo e industrialização da mandioca em grande escala. Segundo Santana (2007), enquanto a produção de etanol de cana-de-açúcar era aperfeiçoada em diversos aspectos tecnológicos e econômicos, a produção de etanol de mandioca era abandonada, sem maiores investimentos e estudos.

Dados da FAO (2008), apresentados na Tabela 7, apontam que, em termos mundiais, a mandioca apresenta maior rendimento na conversão de etanol, em L/t, em relação a culturas como beterraba e cana-de-açúcar (RIZATO; FELIPE, 2009).

Tabela 7- Comparativo de rendimento de diferentes matérias primas para a produção de etanol

Produto	Rendimento (Tonelada/hectare)	Rendimento (Litros/tonelada)	Rendimento do biocombustível (Litros/hectare)
Beterraba	46	110	5.060
Cana-de-açúcar	65	70	4.550
Mandioca	12	180	2.070
Milho	4,9	400	1.960
Arroz	4,2	430	1.806
Trigo	2,8	340	952
Sorgo	1,3	380	494

Fonte: FAO, 2008.

Nos últimos anos, em países asiáticos, principalmente na Tailândia, a mandioca tem sido utilizada para produção de bioetanol (JARDINE, et al., 2009) e tem sido efetivamente empregada em destilarias na Tailândia (KOISUMI, 2008 *apud* BNDES, 2008).

Silva (2012) cita como grande vantagem para a exploração da mandioca na produção de etanol a grande diversidade genética dessa planta no Brasil. Segundo o autor, enquanto 1 tonelada de cana produz 85 litros de etanol, 1 tonelada de mandioca, com rendimento de 33% em amido e de 2% em açúcares, produz 211 litros de etanol combustível. Já existem variedades de mandioca com 36% de amido, o que proporciona 230 litros de etanol combustível por tonelada de mandioca.

Os rendimentos teóricos da fermentação da glicose e do amido podem ser facilmente calculados em 647,0 e 718,9 litros de etanol por tonelada de carboidrato, respectivamente. O maior rendimento teórico da fermentação etanólica do amido deve-se ao fato dessa molécula se apresentar mais desidratada em relação à glicose. Na síntese do amido, a partir da polimerização da glicose, perde-se uma molécula de água para cada ligação α -1 $\rightarrow$ 4 ou α -1 $\rightarrow$ 6 realizada. Por ocasião da hidrólise essa água é novamente incorporada (CEREDA, 2001).

Segundo Cereda (2001), vários autores defendem a produção de etanol a partir da cultura da mandioca, pois o etanol produzido a partir desta matéria-prima apresenta qualidade superior, podendo apresentar outras aplicações além de carburante. O autor defende o incentivo da produção de etanol de mandioca em regiões nas quais as condições de solo são impróprias para o cultivo da cana-de-açúcar e apropriadas para essa raiz, pouco exigente em fertilidade, bem como feita em regiões de baixa densidade demográfica e de baixa renda per capita, como forma de melhorar a distribuição de renda no país.

Enquanto a cana se desenvolveu como um sistema de produção de grande escala, centralizada e concentradora de renda, a mandioca para a produção de etanol pode se basear em um modelo totalmente diferente, de grande escala, porém descentralizada e distribuidora de renda. Esse modelo estaria fundamentado em milhões de pequenas propriedades agrícolas extremamente eficientes, distribuidoras de renda e de novas oportunidades de trabalho pelas regiões interioranas de municípios de pequenas cidades do Brasil (SILVA, 2012).

De acordo com Gonçalves et al. (2009), muitos produtores rurais podem ser beneficiados com o cultivo da mandioca, garantindo, além do cultivo de subsistência, a comercialização para a indústria do etanol. Entre os estudos desenvolvidos, destaca-se o aproveitamento do farelo de mandioca que, além de beneficiar o meio ambiente, possui elevado teor de amido, suscitando o interesse dos industriais na produção de etanol a partir da mandioca (OLIVEIRA, 2011).

Não se pensa em fazer a mandioca desbancar a cana-de-açúcar como produtora de etanol, mas simplesmente recolocá-la no foco de análise econômica alternativa para produtores de pequeno porte. Ou até mesmo como uma opção complementar à ociosidade industrial das usinas de cana-de-açúcar durante a longa entressafra (até 6 meses). Além disto, o etanol de mandioca apresenta alta pureza, sendo ideal para a produção de álcoois finos destinados à perfumaria e bebidas etílicas (SILVA, 2012).

O incentivo a novas alternativas energéticas também pode não só contribuir com as preocupações no que diz respeito a oferta de combustíveis fósseis no

mundo, como a diminuição da poluição atmosférica que os mesmos representam. Entretanto, é necessário analisar certas variáveis para que a obtenção de etanol a partir da mandioca se torne uma alternativa rentável, a exemplo dos custos e viabilidade para a produção deste combustível na região (RIZATO; FELIPE, 2009).

O processo de produção de etanol de mandioca é similar ao processamento da cana. As diferenças estão no preparo da matéria-prima e no sistema de fermentação. No caso da cana, o açúcar presente no colmo é fermentescível, necessitando apenas da extração. Na mandioca, é preciso converter o amido em açúcar fermentescível, o que é feito através do cozimento e da sacarificação, com uso de enzimas ou através de ácido (ÁLCOOL, 2006).

Segundo Cunha (2009), os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácidos, calor e pressão), por via enzimática ou podem sofrer modificações físicas. A seguir são apresentados os tratamentos que mais se destacam no cenário nacional e que foram utilizados neste trabalho.

2.5.1 Tratamento Ácido

O processo mais simples de hidrólise do amido é o tratamento ácido. A hidrólise ácida do amido tem por base o fato da ligação glicídica ser estável em condições alcalinas, mas é rompida em condições ácidas (OSTROWISKI et al., 2006).

Segundo WHISTLER et al. (1984), a taxa de hidrólise do amido depende:

- Do efeito do ácido na ruptura do grânulo;
- Da hidrólise de cada componente do amido (amilose e amilopectina), que varia com a natureza;
- Da hidrólise do polissacarídeo em si, conforme a quantidade e distribuição física das estruturas de amilopectina e amilose.

A hidrólise realizada na presença de catalisadores ácidos apresenta a vantagem de ser mais rápida, porém envolve os custos de recuperação destes catalisadores e problemas de corrosão (KIM et al., 2000).

O emprego de temperatura na hidrólise ácida produz, além de açúcares, produtos de degradação da D-glicose como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido levulínico e ácido fórmico, sendo que os dois últimos são obtidos do 5-HMF. Estes produtos de degradação podem interferir negativamente na fermentação, quando estão em concentrações que os tornam tóxicos para os microorganismos (KUÇUK; DERMIRBAS, 1997).

2.5.2 Tratamento Enzimático

Segundo Ostrowski et al. (2006), a hidrólise enzimática do amido pode ser feita por processos diferentes:

a – Através da maltagem, ou emprego do malte. Este produto é preparado a partir de sementes de cereais, em germinação, secas e reduzidas a pó, e se caracteriza pela sua riqueza em amilase. Adicionado ao amido previamente preparado, o transforma em maltose. Utilizada na produção de uísque e saquê;

b – Pelo processo amilo que consiste no emprego simultâneo de um fungo capaz de produzir amilase que atua sobre o amido (*Rhizopus japonicum*, *R. tonkinensis*, *R. delama*, *Mucor rouxi* e outros) e da levedura encarregada da fermentação do açúcar proveniente da hidrólise. Este processo é utilizado na produção do saquê;

c – Pelo emprego de preparados enzimáticos produzidos previamente em culturas puras, por certos microorganismos (fungos e bactérias).

De acordo com Kilikian (1984) *apud* Abud (1997), a ação combinada das enzimas α -amilase e glicoamilase, apresenta vantagens tais como maiores rendimentos, excelente estabilidade da enzima na estocagem e regularidade na obtenção e utilização das mesmas. Carioca e Arora (1984) *apud* Abud (1997) citam

que a utilização dessa combinação permite obter rendimentos na hidrólise da ordem de 95%.

Segundo ÁLCOOL (2006), a dificuldade de obtenção de enzimas para o processo de hidrólise do amido, a não diferenciação de preços entre o etanol de mandioca e o de cana-de-açúcar, a forte concorrência nos setores de perfumaria, cosmético e farmacêutico, são fatores desfavoráveis na produção do etanol de mandioca. Todavia, a utilização de resíduos da agroindustrialização da mandioca como fonte de carbono para fermentação etanólica tem se mostrado adequada na produção de um etanol com qualidades requeridas para uso na indústria alimentícia e farmacêutica, com ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol e ácidos orgânicos (BRINGHENTI; CABELLO, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho de pesquisa visa estudar o comportamento cinético da fermentação etanólica, conduzida em batelada simples, de dois tipos de farinha de mandioca hidrolisadas ácida e enzimaticamente.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaio de hidrólise ácida com uma mistura (1:1) de dois tipos de farinha de mandioca visando à obtenção de glicose para fermentação;
- Realizar ensaio de hidrólise enzimática com uma mistura (1:1) de dois tipos de farinha de mandioca visando à obtenção de glicose para fermentação;
- Definir concentração inicial de glicose semelhante para os dois tipos de hidrolisados;
- Realizar ensaios cinéticos de fermentação etanólica com os hidrolisados ácido e enzimático, utilizando uma levedura comercial para definição do perfil de consumo de glicose, produção de etanol, crescimento celular e tempo de fermentação;
- Realizar ensaios cinéticos de fermentação etanólica com os hidrolisados utilizando complementação nutricional para as leveduras com uma formulação comercial de nutrientes disponível no mercado;
- Comparar os ensaios de fermentação tomando-se como parâmetros as eficiências de fermentação e de processo, a produtividade e as taxas de conversão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

As farinhas de mandioca utilizadas para as hidrólises foram cedidas por uma casa de farinha do Povoado do Riachão, localizado no município de Junqueiro–AL, e armazenadas em sacos plásticos, mantidos fechados, protegidos de umidade e insolação direta. Os dois tipos de farinha de mandioca produzidos nessa região foram Santa Catarina e Sergipana. Estas farinhas foram misturadas na proporção 1:1 (p/p) para posterior ensaio de hidrólise.

4.2 Microrganismo

No processo fermentativo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (fermento Fermix), vendida na forma de fermento em pó seco.

4.3 Nutriente

O nutriente utilizado para complementar os mostos nas fermentações, foi o Mercofós M+, gentilmente cedido pela Pratense Química. Este nutriente é muito utilizado nas destilarias de etanol para complementar as fermentações de mosto de caldo de cana e melaço.

O Mercofós M+ é um nutriente balanceado, composto por sais de fósforo (35%) e sais amoniacais (35% de NH_4^+), adicionados de sais de magnésio (15%), manganês (4%) e zinco (2%).

Na complementação dos meios de fermentação deste trabalho, foi utilizada a dosagem média indicada pelo fabricante, 10 kg/100 m³.

4.4 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida do amido da farinha de mandioca foi realizada, baseando-se na metodologia utilizada por Gonçalves et al. (2007).

Para o processo de hidrólise ácida foram pesados 200 g de farinha, sendo 100 g de cada tipo (proporção 1:1), e transferidos para frasco Erlenmeyer de 2000 mL. Em seguida, adicionou-se 1000 mL de ácido sulfúrico 1% em cada Erlenmeyer e fez-se a mistura, sendo o Erlenmeyer tampado e levado para autoclave por 2 horas a 121°C e 1,0 atm.

Após a autoclavagem, o hidrolisado foi resfriado à temperatura ambiente, o pH do mesmo foi ajustado com hidróxido de sódio 26% para pH 4,57 e filtrado. Desse filtrado foi retirada uma amostra para determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) e o restante do hidrolisado foi armazenado em geladeira até o momento de uso.

4.5 Hidrólise Enzimática

Para realizar a hidrólise enzimática da farinha de mandioca foi utilizada metodologia descrita por ABUD (1997).

Foram pesados 380 g de farinha, sendo 190 g de cada tipo (proporção 1:1) e transferidos para uma panela de aço inox onde se fez a homogeneização. Após homogeneização, foram adicionados 1000 mL de CaCl_2 0,01 M de modo a se ter uma suspensão de 380 g/L da farinha.

Fez-se nova homogeneização, adicionou-se 0,3 g da enzima α -amilase BioChemika (50 U/mg), fornecida pela SIGMA, e ajustou-se o pH da suspensão entre 6,0 e 6,5, com solução de NaOH 2 N. A suspensão foi aquecida em fogo até a temperatura de 85°C, manteve-se nesta temperatura por 10 minutos, e, depois, levou-se até à ebulição por 5 minutos. Após o aquecimento, a suspensão foi filtrada ainda quente, obtendo-se um xarope. Posteriormente, retirou-se uma amostra para determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART). O pH do xarope de farinha de mandioca foi ajustado para 4,2 utilizando-se solução de HCl 2N.

Foram transferidos 500 mL de xarope para 04 Erlenmeyers de 250 mL, sendo 125 mL para cada, e adicionados a cada frasco 0,6 mL da enzima amiloglicosidase

BioChemika (300 U/mL), fornecida pela SIGMA. Os Erlenmeyers foram tampados e incubados a 45°C e 150 rpm por 16 horas.

Após este tempo, foram recolhidas amostras para dosagem de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) e o hidrolisado foi armazenado em geladeira até momento de uso.

4.6 Meios de Cultura

4.6.1 Meio YPD Líquido

Para o preparo do inóculo nos ensaios de fermentação, utilizou-se meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose), com a seguinte composição:

- 10 g/L de extrato de levedura;
- 20 g/L de glicose;
- 20 g/L de peptona bacteriológica.

Este meio teve seu pH ajustado para 5,0.

4.6.2 Meio Líquido à Base de Hidrolisado Ácido de Farinha de Mandioca

Para fazer o estudo cinético da fermentação com levedura comercial no hidrolisado ácido, fez-se a correção do mosto de modo a se obter 300 mL de meio com concentração de açúcares redutores totais (ART) em torno de 100 g/L.

4.6.3 Meio Líquido à Base de Hidrolisado Enzimático de Farinha de Mandioca

Para fazer o estudo cinético da fermentação com levedura comercial no hidrolisado enzimático, fez-se a correção do mosto de modo a se obter 300 mL de meio com concentração de açúcares redutores totais (ART) em torno de 100 g/L.

4.7 Preparo do Inóculo

Para obtenção do inóculo, foi feita a multiplicação do fermento comercial em meio YPD. Nesta etapa, foram utilizados 0,5 g de fermento seco para 50 mL de meio

YPD, de modo a se obter concentração de inóculo de 10 g/L. Este meio foi levado para incubador rotativo a 30°C e 100 rpm, sendo realizado o acompanhamento do Brix e absorvância até se verificar que a fermentação estava na fase exponencial.

Após este período, o meio foi transferido para três Erlenmeyeres contendo 150 mL de meio YPD cada, sendo incubados a 30°C e 100 rpm, onde se esperou atingir a fase exponencial para realizar a centrifugação do meio. Para a detecção da fase exponencial de crescimento, os valores de absorvância foram convertidos em concentração celular, em g/L, através de curva padrão de peso seco construída previamente. De posse dos valores de concentração celular, foi construída a curva de crescimento celular $\ln(X)$ vs t que possibilitou a verificação da faixa de tempo onde ocorre a fase exponencial.

O meio centrifugado foi ressuspensão em solução salina (NaCl 0,85%) estéril e centrifugado novamente, de forma a retirar resíduos do meio. A massa obtida foi utilizada para a inoculação dos hidrolisados com e sem complementação de nutrientes.

4.8 Testes Preliminares de Fermentação Etanólica

Foram realizados testes preliminares de fermentação para avaliar a capacidade de fermentação da levedura nos hidrolisados ácido e enzimático, o tempo de fermentação e estabelecer o número de amostras a serem feitas no estudo cinético, assim como o volume de meio necessário para as fermentações. Para tal, fez-se a correção do mosto de modo a se obter 50 mL de meio com concentração de açúcares redutores totais (ART) em torno de 100 g/L.

Para obtenção do inóculo para os ensaios preliminares, foi feita a multiplicação do fermento comercial em meio YPD líquido com a composição descrita no item 4.6.1 e pH ajustado em 5,0. Nesta etapa foram utilizados 0,5 g de fermento seco para 50 mL de meio YPD de forma a se obter concentração de inóculo de 10 g/L. Este meio foi levado para incubador rotativo a 30 °C e 100 rpm por 16 horas. Após este período, o meio foi centrifugado e a massa úmida obtida foi utilizada para inocular os meios de fermentação e iniciar os ensaios.

Na inoculação foram utilizados 0,5 g de fermento base úmida para 50 mL de meio, obtendo-se concentração de células em base úmida de 10 g/L em cada ensaio.

Foram realizados três ensaios fermentativos em batelada simples, em incubador rotativo a 30°C e 100 rpm, descritos abaixo:

- meio rico (YPD)
- meio à base de hidrolisado ácido (HA)
- meio à base de hidrolisado enzimático (HE)

4.9 Ensaios de Fermentação Etanólica

Foram realizados quatro ensaios fermentativos, em batelada simples, em estufa bacteriológica a 30°C, descritos abaixo:

- meio à base de hidrolisado ácido sem complementação nutricional (HASN);
- meio à base de hidrolisado ácido com complementação nutricional (HACN);
- meio à base de hidrolisado enzimático sem complementação nutricional (HESN);
- meio à base de hidrolisado enzimático com complementação nutricional (HACN).

Os meios de fermentação foram corrigidos de modo a se obter concentração de açúcar em torno de 100 g/L.

4.10 Metodologia Analítica

Foram feitas análises de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) da farinha antes e após a hidrólise, assim como a determinação da concentração de amido na mesma com a finalidade de calcular o rendimento das hidrólises.

Durante os ensaios de fermentação, acompanhou-se, através de retiradas periódicas de amostras (a cada 2 horas), a concentração celular (X) e os sólidos solúveis totais (Brix). Uma alíquota de 20 mL de cada amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi congelado para posteriores análises de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), etanol (E) e pH. A partir dos resultados experimentais foram traçados os perfis de consumo de substrato, produção de etanol e crescimento celular em função do tempo e determinados os parâmetros fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em etanol ($Y_{E/S}$), fator de conversão células em etanol ($Y_{E/X}$), produtividade em etanol (P_E), produtividade em células (P_X), eficiência de fermentação (n_f (%)) e eficiência de processo (n_p (%)).

4.10.1 Determinação de Amido

A determinação de amido foi feita utilizando metodologia descrita por Carvalho et al. (2002).

A metodologia consiste em pesar 2 g de amostra de farinha e transferir para um Erlenmeyer de 500 mL com o auxílio de 200 mL de água destilada. A essa suspensão são adicionados 1 mL de NaOH a 10%. O Erlenmeyer é tampado adequadamente e levado para autoclave a 121°C por 1 hora. Após esse período, o material retirado é esfriado, adiciona-se 10 mL de HCl concentrado e levado novamente para autoclave a 1 atm por 30 minutos. Passado este tempo, o material é esfriado novamente e faz-se a neutralização com NaOH 40%. Transfere-se para um balão de 250 mL e completa-se o volume com água destilada, faz-se a filtração com papel de filtro, recolhendo o filtrado em Erlenmeyer seco. Esse filtrado é utilizado para determinar os açúcares redutores (AR) e os açúcares redutores totais (ART). Tendo-se estes resultados, calcula-se a concentração de amido, em g/100g ou %, utilizando a Equação 1.

$$\%AMIDO = (ART_{final} - AR_{inicial}) \times 0,9 \quad (1)$$

Onde: 0,9 é o fator de transformação de açúcares redutores em amido.

4.10.2 Massa Celular

A concentração celular foi determinada através de método espectrofotométrico. As amostras foram diluídas na proporção 1:50 e fez-se as leituras de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. O valor de absorvância lido foi convertido em concentração, em g/L, utilizando curvas padrão que relacionam a absorvância com concentração celular em termos de massa seca em g/L. A construção das curvas de peso seco foi feita tomando-se amostras de 10 mL de cada meio (hidrolisado ácido e hidrolisado enzimático) na fase exponencial de crescimento celular em ensaios preliminares. Para cada meio de fermentação foram retiradas duas amostras, que foram centrifugadas e depois secadas em estufa até peso constante. Prepararam-se amostras de concentração celular conhecida, fez-se as leituras de absorvância e construíram-se as curvas de peso seco que relacionam a absorvância com a concentração celular, em g/L, para cada meio de fermentação.

4.10.3 Sólidos Solúveis Totais (Brix)

A determinação dos sólidos solúveis totais (Brix) foi feita através de refratômetro digital. O acompanhamento do consumo de substrato através do Brix é muito utilizado, visto que pode ser determinado através de um método muito prático e por se tratar de um parâmetro que apresenta correlação linear com as concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART). Estas medições no mosto serviram apenas como um parâmetro de acompanhamento da evolução das fermentações, pois vários compostos, como ácidos e álcoois, podem causar interferência no índice de refração e, portanto, nos resultados das leituras.

4.10.4 Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados por espectrofotometria, utilizando o método do DNS, a partir da reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico.

O DNS reagente foi preparado dissolvendo-se à temperatura ambiente 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 20 mL de NaOH 2 N e 50 mL de água destilada. Após a dissolução completa do DNS, adicionou-se 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo

de sódio e potássio - $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); o mesmo foi dissolvido e o volume foi completado com água destilada para 100 mL.

Neste método foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de glicose (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L) e as leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Para “zerar” o espectrofotômetro, foi necessário fazer a leitura com um branco, substituindo o volume da amostra por água destilada na reação de DNS. A partir da curva padrão obteve-se a equação de uma reta, que permitiu calcular a concentração de glicose em cada amostra.

Para a reação de DNS foram transferidos 0,25 mL da amostra, 0,5 mL de água e 0,25 mL de solução de DNS para tubo de ensaio com tampa. Levou-se o tubo para banho fervente, deixando por 5 minutos, permitindo que ocorresse a reação entre a glicose e o DNS. Após este período, colocou-se o tubo em banho de gelo para seu resfriamento. Após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de água destilada ao tubo e foram feitas as leituras de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. De posse das leituras, utilizou-se a curva padrão para calcular a concentração de açúcares redutores (AR) em g/L.

Para a determinação dos açúcares redutores totais (ART), antes de realizar a análise pelo método do DNS, a amostra passou por um processo de hidrólise ácida com H_2SO_4 1,5 M e posterior neutralização com NaOH 40%. Foram transferidos 1 mL da amostra para tubos de ensaio com tampa e adicionados 4 mL de H_2SO_4 1,5 M; em seguida os tubos foram fechados e levados para banho imerso fervente deixando-se por 30 minutos para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores, tendo o cuidado de agitar os tubos a cada 5 minutos. Após este período, deixou-se esfriar e neutralizou-se com NaOH 40% e fenolftaleína como indicador; em seguida tornou-se a solução incolor com H_2SO_4 1,5 M, filtrou-se e completou-se o volume para 25 mL.

4.10.5 Etanol

A determinação da concentração de etanol foi feita através de oxidação com dicromato de potássio e espectrofotometria. Este método baseia-se na oxidação de

uma mistura hidroalcoólica a ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire tonalidade verde proporcional à concentração de etanol na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro (STECKELBERG, 2001). Para a utilização deste método foi necessária destilação prévia das amostras e construção de uma curva padrão com leituras de amostras de etanol com concentrações conhecidas (10, 20, 40, 60, 80 e 100 g/L). Após a destilação, as amostras foram transferidas para balão volumétrico e o volume completado para 100 mL com água destilada.

A reação do dicromato foi feita colocando-se 2 mL do destilado e 2 mL de solução de dicromato em um tubo de ensaio com tampa. O tubo foi levado para banho-maria a 60°C por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi resfriado e fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. O branco foi feito substituindo a amostra por água destilada. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em concentração de etanol, em g/L, através do uso da curva padrão.

4.11 Cálculo da Eficiência da Hidrólise e dos Parâmetros do Processo

4.11.1 Rendimento das Hidrólises

O rendimento em porcentagem (%) dos processos de hidrólise foi calculado utilizando a Equação 2, descrita por Oliveira (2011).

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{AR no hidrolisado (g/L)}}{\text{Amido na farinha (g/L) + AR inicial (g/L)}} \cdot 100 \quad (2)$$

4.11.2 Produtividade e Fatores de Conversão Globais

Para analisar os tratamentos, foram calculadas as produtividades e os fatores de conversão relativos às concentrações celular, de substrato e de etanol, conforme equações a seguir:

- Fator de conversão de substrato em etanol (g de etanol /g de substrato):

$$Y_{E/S} = \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad (3)$$

- Produtividade em etanol (g de etanol/L.h):

$$P_E = \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad (4)$$

- Fator de conversão células em etanol (g de etanol /g de células):

$$Y_{E/X} = \frac{\Delta E}{\Delta X} \quad (5)$$

- Produtividade em células (g de células/L.h):

$$P_X = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (6)$$

- Fator de conversão substrato em células (g de células/g de substrato):

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (7)$$

4.11.3 Eficiência de Fermentação e de Processo

A partir dos valores obtidos para o fator de conversão substrato em etanol, foram calculadas as eficiências de fermentação e de processo como segue.

- Eficiência de fermentação (η_f (%)), com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (0,511 g de etanol . 1g de glicose⁻¹):

$$\eta_f (\%) = \frac{Y_{E/S}}{0,511} . 100 \quad (8)$$

- Eficiência de processo (η_p (%)), com base na concentração inicial de açúcar S_0 :

$$\eta_p (\%) = \frac{\Delta E}{0,511 . S_0} . 100 \quad (9)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento dos Processos de Hidrólise

A mistura das farinhas de mandioca antes dos tratamentos de hidrólise apresentou concentração de açúcares redutores totais (ART) de $39,90 \pm 2,48$ g/100g de farinha (Tabela 8). Este valor está de acordo com os valores apresentados por Costa (2010), que chegou aos valores 35,91 e 39,23 g/100g de farinha para as farinhas Santa Catarina e Sergipana, respectivamente.

A Tabela 8 apresenta os valores de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), assim como o valor da concentração de amido da mistura das farinhas de mandioca utilizadas.

Tabela 8 - Concentração de açúcares e de amido da mistura das farinhas de mandioca

	AR g/100g	ART g/100g
FARINHA	$12,07 \pm 0,33$	$39,90 \pm 2,48$
FARINHA HIDROLISADA	$77,08 \pm 1,10$	$97,32 \pm 5,51$
AMIDO (%)		76,72

Fonte: Autor, 2013.

A concentração de amido obtida foi de 76,72%, valor próximo aos apresentados por Costa (2010), que encontrou 80,35 e 74,01% de amido para as farinhas Santa Catarina e Sergipana, respectivamente. Vários autores têm relatado diferentes concentrações de amido na farinha de mandioca, entre eles, Andrade & Lima (1984), 87%, e Ferreira et al. (2005), que relatam 71,65% de amido para outros tipos de farinha de mandioca.

As diferentes concentrações de amido podem ser justificadas pelo fato de as farinhas serem produzidas a partir de diferentes variedades de mandioca, e estas, por sua vez, apresentarem diferentes composições.

Os hidrolisados obtidos apresentaram concentração de açúcar suficiente para as fermentações, sendo desnecessária a concentração do meio.

A tabela 9 apresenta os valores da média e desvio padrão de duas repetições das análises das concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) dos hidrolisados ácido e enzimático.

Tabela 9 - Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) dos hidrolisados

HIDROLISADO ÁCIDO				
ENSAIO	AR		ART	
	g/L	g/100g	g/L	g/100g
1	141,33 ± 4,65	70,67 ± 4,65	181,60 ± 1,16	90,80 ± 1,16
2	143,30 ± 1,86	71,65 ± 1,86	187,35 ± 0,00	93,67 ± 0,00
HIDROLISADO ENZIMÁTICO				
ENSAIO	AR		ART	
	g/L	g/100g	g/L	g/100g
1	330,10 ± 8,81	86,87 ± 8,81	347,23 ± 6,61	91,38 ± 6,61
2	331,35 ± 7,05	87,20 ± 7,05	353,46 ± 2,20	93,01 ± 2,20

Fonte: Autor, 2013.

Observa-se na Tabela 9 que obteve-se concentração de açúcares redutores totais (ART), em torno de 185 g/L no hidrolisado ácido, concentração esta que dispensa concentração do mosto e pode, também, dispensar a diluição do mesmo para utilização nas fermentações. Já a concentração destes açúcares no hidrolisado enzimático chega a ser quase o dobro do conseguido com o tratamento ácido, em torno de 348 g/L. Esse fato destaca o tratamento enzimático como aquele que apresenta um hidrolisado com maior concentração de açúcares, necessitando de diluição para se obter concentrações mais adequadas para a fermentação.

Os rendimentos das hidrólises foram calculados utilizando a Equação 2 e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Rendimentos das hidrólises

HIDRÓLISE	ENSAIO	RENDIMENTO (%)
ÁCIDA	1	79,59
	2	80,70
ENZIMÁTICA	1	97,83
	2	98,20

Fonte: Autor, 2013.

Como era esperado, a hidrólise enzimática apresentou rendimento superior à hidrólise ácida. Isso se deve ao fato de as enzimas quebrarem as moléculas de amido de modo específico e seletivo, ao passo que a hidrólise ácida tende a gerar açúcares não fermentáveis e produtos secundários, contribuindo para a queda de rendimento.

Os resultados obtidos na hidrólise ácida foram superiores aos apresentados por Costa (2010), que obteve 56,81 e 60,78% de rendimento na hidrólise das farinhas Santa Catarina e Sergipana, respectivamente, utilizando tratamento com ácido sulfúrico 1% em autoclave a 1,5 atm por 1 hora.

Oliveira (2011), trabalhando com farelo residual do processamento de fécula de mandioca, realizou tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações e tempo de reação, conseguindo rendimentos de hidrólise que variaram entre 19,09 e 96,48%, sendo o melhor resultado conseguido com o tempo de reação de 90 minutos e pH 0,5. Freitas et al. (2009) obtiveram rendimentos que variaram entre 68,87 e 87,08%, obtendo melhores resultados com tempo de reação de 1 hora e pH 0,5 no tratamento com ácido sulfúrico 9,14 M, em autoclave a 121°C e 1 atm.

Os rendimentos de hidrólise ácida conseguidos neste trabalho também foram superiores aos apresentados por Agu et al. (1997), que obtiveram rendimento de 60% na concentração ácida de 0,3 M após 30 minutos de reação. Os maiores valores dos rendimentos de hidrólise ácida estão relacionados, principalmente, com a concentração do ácido e com o maior tempo de reação utilizados no tratamento.

Os resultados obtidos com a hidrólise enzimática também foram superiores aos apresentados por Costa (2010), que obteve 92,56 e 74,07% de rendimento na hidrólise das farinhas Santa Catarina e Sergipana, respectivamente.

Santana (2007) estudou a eficiência da hidrólise do amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e obteve 81,01, 82,83, 89,76 e 93,18%, utilizando malte de centeio, trigo, milho e cevada, respectivamente. Leonel e Cereda (1998) obtiveram rendimento de até 97% na hidrólise de uma suspensão de farelo de

mandioca com 6% de amido, utilizando celulase e pectinase como enzimas complementares à ação das amilases.

Eduardo (2002), estudando a produção de xarope de maltose a partir de mandioca e puba, através da hidrólise com dois diferentes tipos de α -amilase, obteve 59,1% de eficiência de hidrólise em uma concentração de sólidos de 10%. Quando utilizado puba de mandioca, o maior rendimento foi de 52,1%, em uma concentração de 20% de sólidos. Curvelo-Santana et al. (2010), estudando a otimização da produção de etanol de mandioca, conseguiram com tratamento enzimático 80,5% de rendimento.

Demiate et al. (1997), avaliando a farinha de mandioca e o fubá de milho como substratos para a obtenção de bebida fermento-destilada, realizaram a hidrólise com α -amilase e amiloglicosidase e obtiveram rendimento de 57,4 e 66,4% para o fubá de milho e a farinha de mandioca, respectivamente.

5.2 Ensaios de Fermentação Etanólica Preliminar

Os ensaios preliminares de fermentações, realizados com os meios YPD, HA (hidrólise ácida) e HE (hidrólise enzimática), possibilitaram o acompanhamento da evolução das fermentações através de determinações periódicas do Brix e da concentração celular (X) dos meios. Também foi possível avaliar o comportamento da levedura utilizada na fermentação, estabelecer o tempo para acompanhamento das fermentações, o número de pontos para o estudo cinético e o volume de meio necessário para os ensaios, além de confirmar alguns métodos analíticos a serem utilizados.

Os valores de Brix e concentração celular (X) determinados durante as fermentações preliminares estão apresentados na Tabela 11. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers, com 1% (p/v) de inóculo, em incubador *shaker* a 30°C e 100 rpm.

O final de cada fermentação foi detectado através do acompanhamento do Brix. Assim, verificou-se que as fermentações dos meios YPD, HA e HE terminaram após 5, 21 e 22 h, respectivamente. Baseando-se nestes tempos de fermentação e

levando em consideração a agitação nos ensaios preliminares, escolheu-se o tempo de fermentação de 30 h para fazer o estudo cinético da fermentação em estufa bacteriológica.

Como era esperado, o tempo de fermentação para o meio YPD foi o menor, visto que este meio apresenta menor concentração de açúcar e características mais favoráveis às leveduras em relação aos meios à base de hidrolisado ácido e enzimático. O maior tempo de fermentação para os meios à base de hidrolisado ácido e enzimático deve-se ao fato destes meios serem menos ricos em nutrientes que favorecem o crescimento das leveduras.

Tabela 11 - Concentração celular (X) e Brix com o tempo para os meios, YPD, HA e HE

t(h)	X (g/L)			BRIX (g/100g)		
	YPD	HA	HE	YPD	HA	HE
0	3,03	4,12	4,53	5,3	15,30	12,4
1	3,14	4,43	4,35	5,1	15,30	12,1
2	4,10	4,25	4,63	4,6	15,30	11,9
3	4,85	4,63	5,33	4,1	14,70	11,5
4	5,38	5,26	5,92	3,8	14,30	11,0
5	5,29	5,14	5,64	3,7	13,90	10,3
6	5,27	4,86	6,05	3,7	13,50	10,1
7	-	5,04	5,79	-	13,00	9,8
8	-	5,31	5,41	-	12,70	9,6
9	-	5,62	5,38	-	12,40	8,9
10	-	5,47	6,05	-	12,10	8,7
11	-	6,15	6,23	-	11,40	8,4
12	-	6,45	6,47	-	9,90	8,1
13	-	6,81	6,52	-	9,60	6,2
14	-	7,67	5,90	-	9,10	6,0
15	-	7,84	7,97	-	8,80	5,6
16	-	7,52	7,50	-	8,4	5,3
17	-	7,49	7,71	-	8,2	5,2
18	-	7,72	6,78	-	7,9	4,9
19	-	7,36	7,40	-	7,7	4,7
20	-	6,93	6,88	-	7,5	4,6
21	-	8,20	8,74	-	7,3	4,2
22	-	7,79	8,04	-	7,3	4,1
23	-	-	8,56	-	-	4,1

Fonte: Autor, 2013.

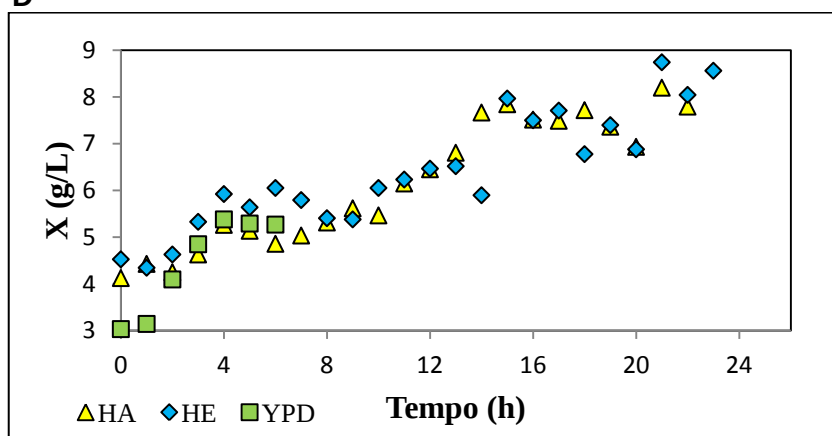
O maior Brix apresentado pelo meio à base de hidrolisado ácido (HA) pode ser justificado pela degradação do meio após período de armazenamento,

provavelmente causado pela presença de produtos resultantes do processo de hidrólise ácida, tais como furfural e hidroximetilfurfural (HMF). As leituras de Brix dos hidrolisados não foi feita após os processos de hidrólise, deixando-se para fazer essas leituras apenas no momento de uso nas fermentações. Análises de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foram feitas após armazenamento dos meios, verificando-se que houve queda significativa destes açúcares nos hidrolisados ácidos, evidenciando a degradação deste meio com o tempo de armazenamento.

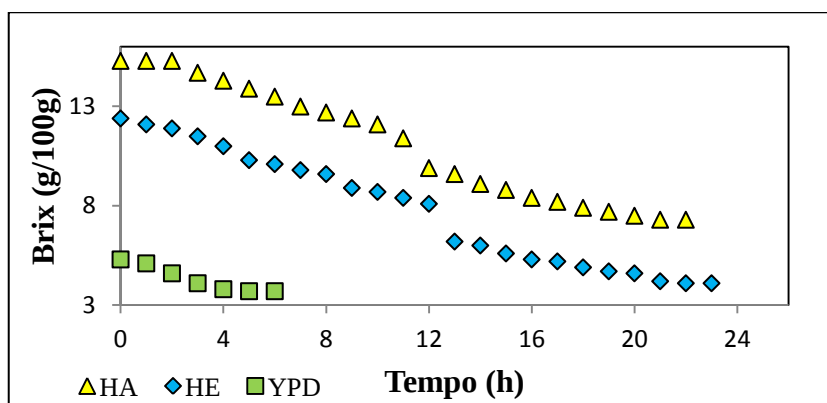
A partir dos dados apresentados na Tabela 11, foram construídos os gráficos de teor de sólidos solúveis (Brix) e concentração celular (X) com o tempo de fermentação (Figuras 17 e 18), que mostram a evolução destes parâmetros durante a fermentação para cada meio utilizado.

Analisando as Figuras 17 e 18, verifica-se que a concentração celular (X) apresenta perfil crescente ao longo das fermentações, enquanto a concentração de substrato, representada pelo Brix, apresenta perfil decrescente ao longo das mesmas. Assim, constata-se que houve comportamento esperado durante as fermentações, ocorrendo consumo de substrato pelas leveduras e consequente crescimento das mesmas. Verifica-se também que a fermentação em meio YPD foi mais rápida, fato esperado em virtude da menor quantidade de açúcares desse meio.

Figura 17 -Evolução da concentração celular (X) com o tempo para os meios HA, HE e YPD



Fonte: Autor, 2013.

Figura 18 - Evolução do Brix com o tempo para os meios HA, HE e YPD

Fonte: Autor, 2013.

Foram realizadas análises de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) de cada meio no início e após o término das fermentações, possibilitando verificar o consumo de açúcar pela levedura. Também foram feitas análises de etanol (E) dos meios após a fermentação para verificar a conversão dos açúcares em etanol pelas leveduras. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12, onde a concentração de substrato (S_0 e S_f) refere-se ao ART.

Tabela 12 - Parâmetros de início e fim de fermentação para os meios YPD, HA e HE

	YPD	HA	HE
S_0 (g/L)	20,00	112,22	106,95
S_f (g/L)	7,24	26,16	8,64
X_0 (g/L)	3,03	4,12	4,53
X_f (g/L)	5,29	8,20	8,04
E_0 (g/L)	0,00	0,00	0,00
E_f (g/L)	8,43	54,83	54,55
t (h)	5	21	22

Fonte: Autor, 2013.

Através da análise dos parâmetros de início e fim de fermentação, verifica-se que as leveduras se comportaram bem nos meios à base de hidrolisados ácido e enzimático, apresentando consumo de açúcar e produção de etanol satisfatórios. Dessa forma, constatou-se que a concentração de açúcares redutores totais (ART)

dos meios e a concentração celular utilizados foram adequadas e as leveduras apresentaram boa capacidade de fermentação nessas condições.

5.3 Fermentação Etanólica

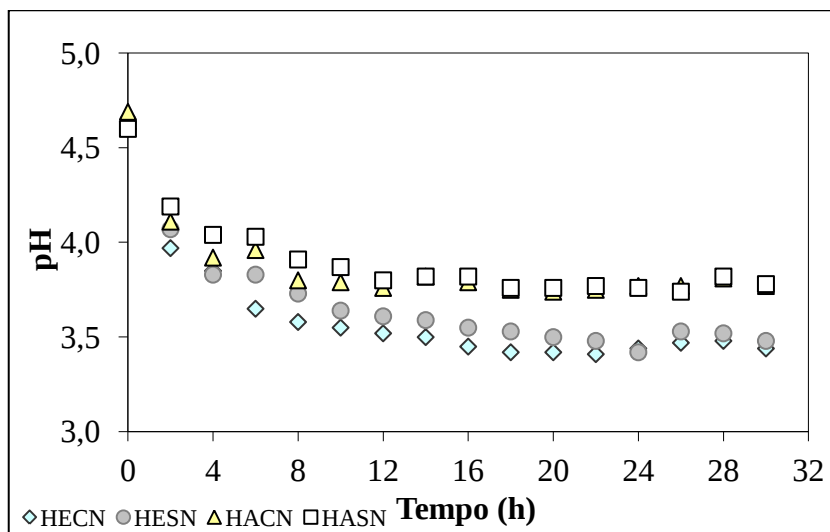
As fermentações foram acompanhadas durante 30 h. O volume útil de cada fermentação foi de 300 mL. Foram realizados quatro ensaios fermentativos, dos quais dois (um com meio à base de hidrolisado ácido e outro à base de hidrolisado enzimático) foram complementados com o nutriente comercial Mercofos M+, na concentração média indicada pelo fabricante, 10 kg de nutriente por 100 m³ de meio de fermentação.

Durante as fermentações foram coletadas amostras a cada 2 h para determinação de pH, concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração celular (X) e concentração de etanol (E). Dessa forma, foram coletadas 16 amostras de cada fermentação e os dados obtidos foram agrupados e utilizados para traçar os perfis de concentração de substrato, concentração celular e concentração de etanol para cada fermentação.

A Figura 19 apresenta a evolução do pH dos meios de fermentação durante os processos fermentativos.

A análise do pH indica a normalidade da fermentação. Pode-se notar queda acentuada do pH nas primeiras 2 h de fermentação e, após este período, queda gradual do mesmo até o final da fermentação. Este comportamento do pH foi similar para todos os ensaios de fermentação. Os meios de fermentação à base de hidrolisado enzimático apresentaram queda mais acentuada do pH em relação aos meios à base de hidrolisado ácido durante toda a fermentação.

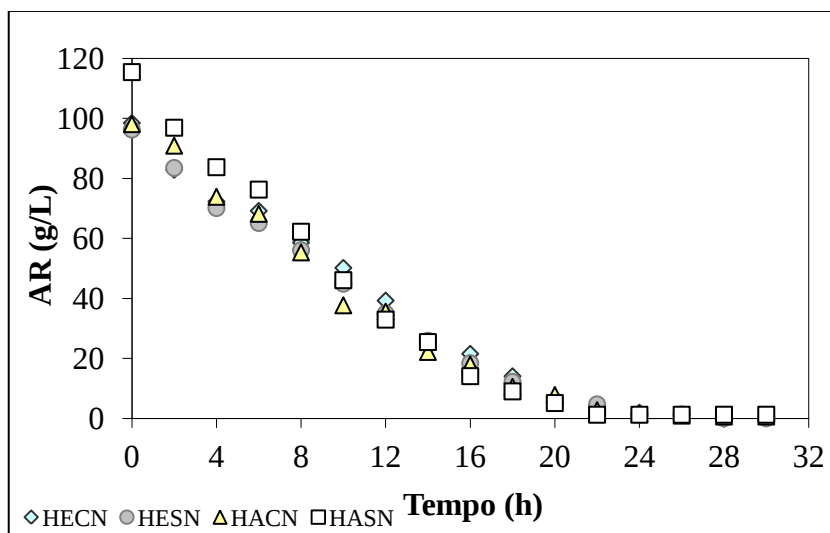
Figura 19 - pH dos meios de fermentação durante os processos fermentativos



Fonte: Autor, 2013.

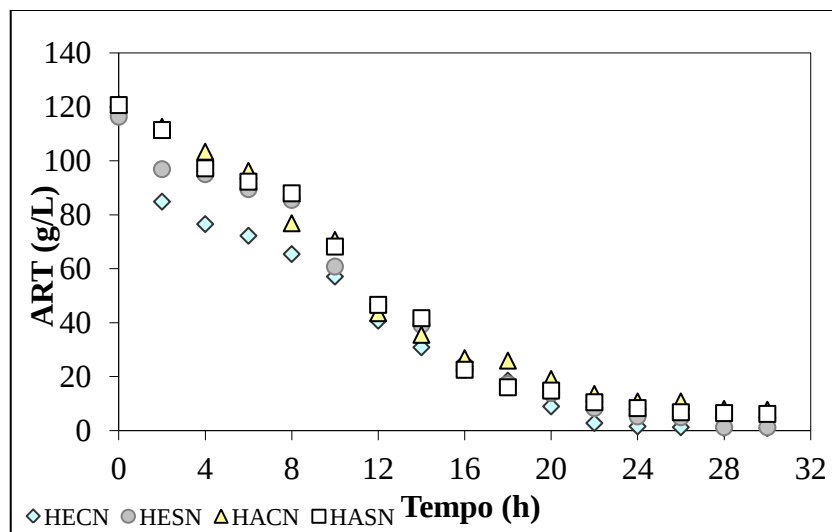
Os perfis de concentração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) dos meios de fermentação durante os processos fermentativos estão apresentados nas Figuras 20 e 21. Estes perfis permitem a análise do consumo de substrato pelas leveduras durante os processos fermentativos.

Figura 20 -Perfil de concentração de açúcares redutores (AR) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos



Fonte: Autor, 2013.

Figura 21 -Perfil de concentração de açúcares redutores totais (ART) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos

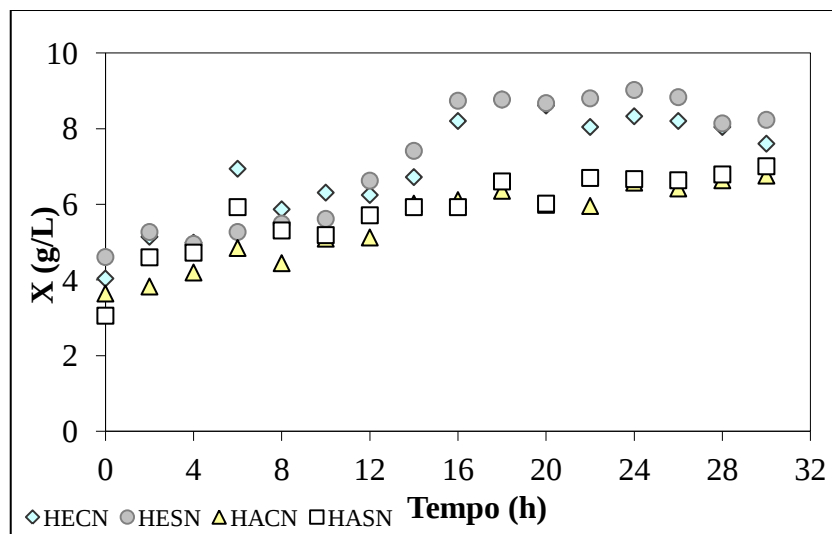


Fonte: Autor, 2013.

A boa definição dos perfis de concentração de substrato indica normalidade do processo fermentativo, havendo consumo adequado do substrato pelas leveduras. Observa-se destes perfis que ocorreu consumo significativo de substrato nas primeiras duas horas de fermentação. Todos os meios de fermentação apresentam redução mais acentuada da concentração de substrato até as 18 h de fermentação. Após este período, pode-se visualizar queda menos intensa e com tendência a estabilidade. Esse comportamento foi semelhante para todos os meios de fermentação, porém os perfis dos meios de fermentação à base de hidrolisado enzimático apresentam maior consumo de substrato em relação ao consumo nos meios de fermentação à base de hidrolisado ácido. Esse fato pode se dar devido às melhores características dos meios à base de hidrolisado enzimático frente aos meios à base de hidrolisado ácido, que contém interferentes decorrentes do processo de hidrólise ácida, ocorrendo melhor desempenho das leveduras.

Os perfis de concentração celular dos meios de fermentação ao longo dos processos fermentativos estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Perfil de concentração celular (X) dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos

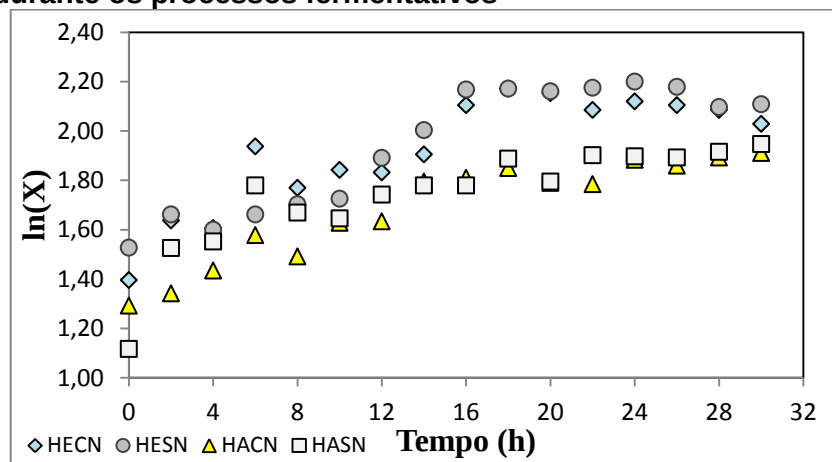


Fonte: Autor, 2013.

Analisando a concentração celular ao longo das fermentações (Figura 22), observa-se que houve crescimento mais acentuado nos meios à base de hidrolisado enzimático em relação aos meios à base de hidrolisado ácido, indicando melhor desempenho das leveduras naqueles meios. Essa diferença se justifica, visto que a hidrólise ácida gera produtos que interferem na fermentação.

A Figura 23 apresenta o perfil de crescimento celular dos meios de fermentação.

Figura 23 - Curva de crescimento celular dos diferentes meios de fermentação durante os processos fermentativos



Fonte: Autor, 2013.

Observa-se destes perfis que a fase *lag* foi discreta, ocorrendo crescimento celular já nas primeiras 2 h de fermentação, fato que indica que houve uma boa adaptação das leveduras aos diversos meios de fermentação. Até 18 h de fermentação houve crescimento celular acelerado em todos os meios de fermentação. Após esse período, pode-se visualizar desaceleração e estabilização do crescimento.

A partir das curvas de crescimento celular foram calculados os valores de velocidade específica de crescimento celular (μ_x) nos meios de fermentação (Tabela 13). Para tal, foram traçadas e ajustadas retas na fase exponencial de crescimento e determinadas as inclinações das respectivas retas, que correspondem à velocidade específica de crescimento.

Tabela 13- Velocidade específica de crescimento para os diferentes meios de fermentação

	HASN	HACN	HESN	HECN
$\mu_x (h^{-1})$	0,023	0,031	0,041	0,040
Faixa de tempo (h)	2 a 18	2 a 18	4 a 18	4 a 18

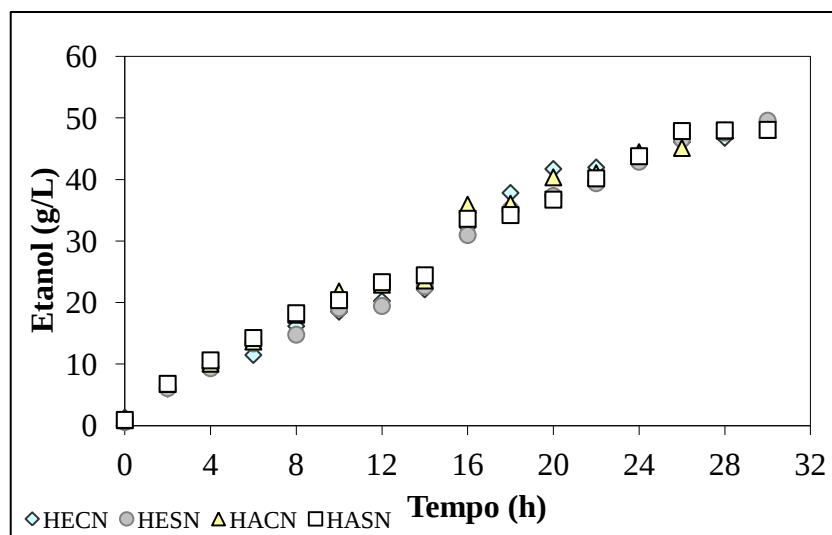
Fonte: Autor, 2013.

Avaliando as velocidades específicas de crescimento celular, verifica-se que os meios à base de hidrolisado enzimático apresentaram maiores velocidades em relação aos meios à base de hidrolisado ácido. Esse fato se justifica pelas melhores características dos meios à base de hidrolisado enzimático.

Quanto à adição de nutriente nos meios de fermentação, observa-se que a complementação nutricional contribuiu de forma significativa para o aumento da velocidade específica de crescimento nos meios à base de hidrolisado ácido. Isso se justifica pela deficiência nutricional desses meios de fermentação em decorrência do tratamento ácido para hidrólise do amido da farinha. No entanto, o mesmo não ocorreu nos meios à base de hidrolisado enzimático. Fato que pode ser justificado pela melhor qualidade desse meio, que necessita de menor complementação nutricional.

A Figura 24 apresenta os perfis de concentração de etanol (E) dos meios de fermentação durante os processos fermentativos. Os perfis apresentam comportamento semelhante para todos os meios de fermentação e indicam produção de etanol satisfatória durante os processos fermentativos. Verifica-se maior produtividade nas primeiras 18 h de fermentação, ocorrendo, a partir desse período, produtividade mais discreta e tendência à estabilização da produção a partir das 26 h, fato justificado pela menor quantidade de açúcar no meio e pela inibição da levedura devido à alta concentração de etanol.

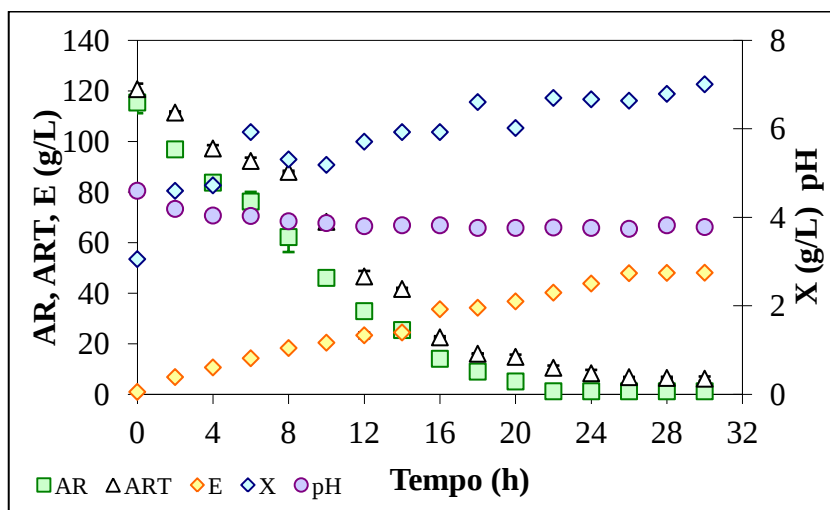
Figura 24 -Perfil de concentração de etanol dos meios de fermentação durante os processos fermentativos



Fonte: Autor, 2013.

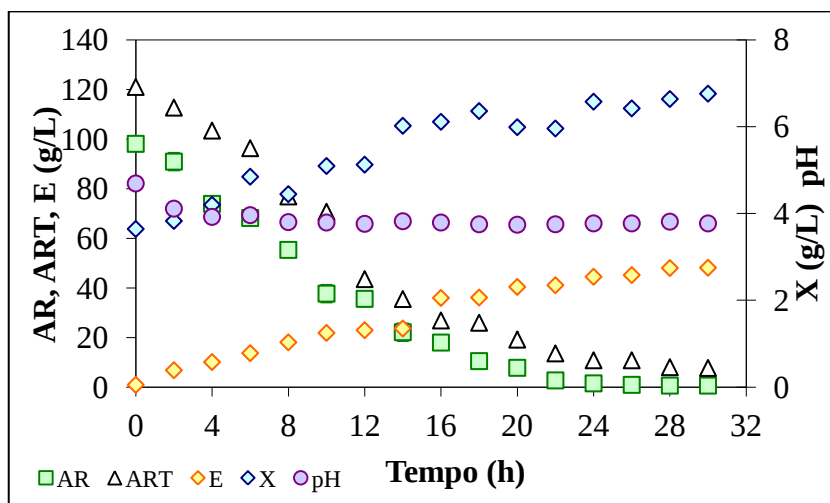
Os gráficos com o agrupamento dos perfis de concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração celular (X), concentração de etanol (E) e pH para todos os meios de fermentação estão ilustrados nas Figuras 25 a 28. Através destes perfis visualiza-se o comportamento cinético das fermentações etanólicas, conduzidas em batelada simples, e evidencia-se a variação das concentrações de células (X), açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e etanol durante as fermentações.

Figura 25 -Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado ácido sem complementação nutricional (HASN)



Fonte: Autor, 2013.

Figura 26 -Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado ácido com complementação nutricional (HACN)

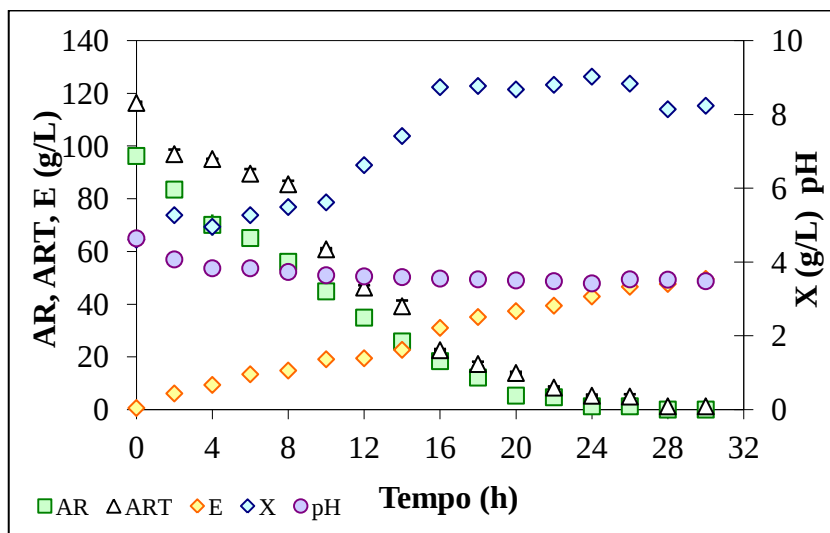


Fonte: Autor, 2013.

Analisando as fermentações em meio à base de hidrolisado ácido, observa-se que o comportamento cinético foi semelhante em todos os ensaios de fermentação, independentemente da complementação nutricional dos meios. As concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) decrescem desde o início

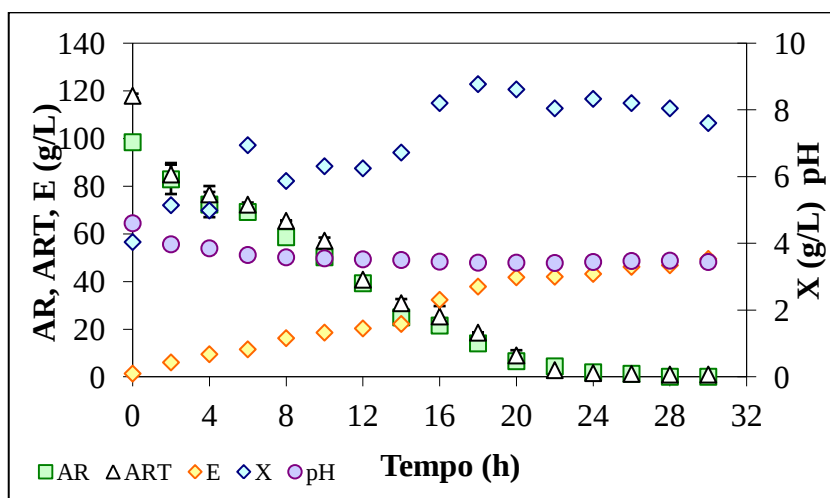
da fermentação, apresentando queda de forma aproximadamente exponencial no decorrer do processo até 20 h, após este período, a queda é menos acentuada e apresenta tendência à estabilização.

Figura 27 -Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado enzimático sem complementação nutricional (HESN)



Fonte: Autor, 2013.

Figura 28 -Perfis de concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), concentração de etanol (E), concentração celular (X) e pH para o meio de fermentação à base de hidrolisado enzimático com complementação nutricional (HECN)



Fonte: Autor, 2013.

Analisando os perfis cinéticos das fermentações dos meios à base de hidrolisado enzimático, verifica-se que estes meios apresentam comportamento semelhante aos dos meios à base de hidrolisado ácido.

Observando a relação entre os perfis de crescimento celular e produção de etanol, verifica-se que a produção de etanol é associada ao crescimento celular. A relação estabelecida entre a concentração de substrato, concentração de produto formado e concentração celular durante as fermentações, indica que os processos fermentativos ocorreram de forma adequada e ilustram bem o perfil cinético das fermentações.

Os dados de início e fim do processo fermentativo, assim como os parâmetros fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em etanol ($Y_{E/S}$), fator de conversão células em etanol ($Y_{E/X}$), produtividade em etanol (P_E), produtividade em células (P_X), eficiência de fermentação (n_f (%)) e eficiência de processo (n_p (%)), estão apresentados na Tabela 14, onde a concentração de substrato (S) refere-se ao ART. Salienta-se que os fatores de conversão e as produtividades foram calculados conforme o item 4.11.2, considerando como tempo final de fermentação o tempo de 30 h, estabelecido para os ensaios.

Tabela 14- Dados de início e final do processo fermentativo, parâmetros fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em etanol ($Y_{E/S}$), fator de conversão células em etanol ($Y_{E/X}$), produtividade em etanol (P_E), produtividade em células, eficiência de fermentação (n_f (%)) e eficiência de processo (n_p (%))

	HASN	HACN	HESN	HECN
S_0 (g/L)	120,67	120,98	116,35	117,89
S_f (g/L)	6,17	7,72	1,23	0,93
X_0 (g/L)	3,06	3,64	4,61	4,04
X_f (g/L)	7,01	6,76	8,23	7,60
E_0 (g/L)	0,95	0,90	0,60	1,34
E_f (g/L)	48,09	48,11	49,59	49,45
t (h)	30	30	30	30
ΔS (g/L)	114,50	113,26	115,12	116,97
ΔE (g/L)	47,14	47,21	48,99	48,11
$Y_{E/S}$	0,41	0,42	0,43	0,41
P_E (g/L.h)	1,57	1,57	1,63	1,60
ΔX (g/L)	3,95	3,12	3,62	3,56
$Y_{E/X}$	11,93	15,13	13,53	13,51
P_X (g/L.h)	0,13	0,10	0,12	0,12
$Y_{X/S}$	0,034	0,028	0,031	0,030
n_f (%)	80,23	82,19	84,15	80,23
n_p (%)	76,45	76,37	82,40	79,86

Fonte: Autor, 2013.

Os resultados obtidos indicam que as fermentações ocorreram de forma adequada. A concentração de ART no final das fermentações indica que houve consumo de quase todo substrato pelas leveduras. No entanto, os meios fermentados à base de hidrolisado ácido apresentaram concentração de substrato residual de 6,17 e 7,72 g/L para os meios sem complementação e com complementação nutricional, respectivamente, enquanto os meios à base de hidrolisado enzimático apresentaram residual de 1,23 e 0,93 g/L para os meios com complementação e sem complementação nutricional, respectivamente. A menor concentração de ART residual nos meios fermentados à base de hidrolisado enzimático e o consequente maior consumo desses açúcares são indicativos de que estes meios oferecem melhores condições para as leveduras.

A concentração de etanol nos meios fermentados indica que houve conversão satisfatória de substrato em etanol pela ação das leveduras. Observa-se uma concentração final praticamente igual para os meios de fermentação à base de hidrolisado ácido, seja com a complementação ou sem complementação nutricional, ocorrendo o mesmo com os meios de fermentação à base de hidrolisado enzimático. Também se observa que houve maior produção de etanol nos meios à base de hidrolisado enzimático, fato justificado pelo maior consumo de substrato nas fermentações com esses meios de fermentação. Como consequência, observa-se para estes últimos meios, valores um pouco superiores para a produtividade em etanol (P_E) e para as eficiências de fermentação n_f (%) e de processo n_p (%).

A concentração de etanol encontrada no final das fermentações está próxima aos resultados obtidos por Santana (2007) que conseguiu valores que variaram entre 39,10 a 48,98 g/L utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus* na fermentação de hidrolisado de amido de mandioca. Vale ressaltar que os melhores resultados registrados pelo autor foram conseguidos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores de concentração também estão próximos ao apresentado por Birol et al. (1998) que obtiveram concentração de etanol de 43,8 g/L na fermentação de meio com 10% de amido, utilizando uma variedade geneticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae*.

Jamai et al. (2007) obtiveram concentração de etanol de 43,1 g/L após 65 h, a partir de amido solúvel, enquanto Shigechi et al. (2002) conseguiram produzir 60 g/L após aproximadamente 100 h de fermentação em condições anaeróbias.

O fator de conversão substrato em etanol $Y_{E/S}$ obtido para os meios de fermentação utilizados neste trabalho estão próximos ao apresentado por Knox et al. (2004) que avaliaram a produção de etanol a partir de amido e obtiveram taxa de conversão de substrato em etanol da ordem de 0,4 g de etanol/g de amido após 120 h em cultivo anaeróbio. Abud (1997) obteve 0,38 g de etanol/g de glicose na fermentação de xarope de glicose obtido da hidrólise enzimática da farinha de mandioca, utilizando uma levedura de linhagem recombinante (L-36). Santana (2007) relata fatores de conversão substrato em etanol de 0,45 g de etanol/g de substrato na fermentação de mosto de amido de mandioca hidrolisado por enzimas do malte de trigo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Os fatores de conversão células em etanol $Y_{X/S}$ encontrados estão próximos aos apresentados por Abud (1997) que obteve o valor de 0,03 g de células/g de substrato. No entanto, os fatores de conversão foram inferiores aos obtidos em meio YPD (0,177 g de células/g de substrato), fato que destaca a importância de um meio rico em nutrientes para o bom desenvolvimento das leveduras.

Quanto a produtividade em etanol (P_E), verifica-se que as fermentações dos meios à base de hidrolisado enzimático apresentaram os valores 1,63 e 1,60 g/L.h para os meios com complementação e sem complementação nutricional, respectivamente, valores estes superiores aos encontrados para os meios à base de hidrolisado ácido, 1,57 g/L.h para os meios com complementação e sem complementação nutricional. Estes valores foram inferiores ao apresentado por Abud (1997) que obteve produtividade em etanol de 1,85 g/L.h em 30 horas de fermentação com a levedura de linhagem recombinante L-36. Também são inferiores a produtividade conseguida em meio YPD (1,69 g/L.h), mas se apresentam superiores à produtividade obtida por Oliveira (2011) que relata 0,9 g/L.h após 12 h de fermentação do hidrolisado de farelo de mandioca. Costa (2010), trabalhando com os hidrolisados das farinhas Santa Catarina e Sergipana, realizou fermentação com o fermento comercial Fermix e conseguiu produtividades que variam entre 1,38

e 1,35 g/L.h para os hidrolisados ácido e entre 1,75 e 1,82 g/L.h para os hidrolisados enzimáticos após 48 h de fermentação.

A produtividade em células (P_x) para os meios à base de hidrolisado ácido e enzimático variou entre 0,10 a 0,13 g/L. Abud (1997) encontrou produtividade em células superior, 0,17 g/L.h. As produtividades em células também foram bastante inferiores a conseguida em meio YPD (0,45g/L.h), fato que também pode ser justificado pela riqueza em nutrientes apresentada pelo meio YPD frente aos meios à base de hidrolisado de farinha de mandioca.

Analisando os dados referentes a eficiência da fermentação etanólica, ao se considerar 30 h de fermentação, verifica-se os valores 80,23, 82,19, 84,15 e 80,23% para os meios HASN, HACN, HESN e HECN, respectivamente. Estas eficiências foram inferiores a conseguida por Abraham et al. (1987) que, após 48 h de fermentação de mosto de farinha de mandioca suplementado, obtiveram 97,4% de eficiência de fermentação. Demiate et al. (1997) também obtiveram rendimento superior, 97,3% após 100,4 h de fermentação. No entanto, as eficiências de fermentação foram superiores a conseguida por Augustini & Junior (2007), que relatam 71,43% de rendimento de fermentação utilizando fermento de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) na produção de etanol de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural.

Os valores apresentados na literatura para eficiência de fermentação de meio obtido de material amiláceo são bastante variados. Abud (1997) conseguiu 74,3% de rendimento na fermentação de xarope de glicose, obtido da hidrólise enzimática da farinha de mandioca, utilizando a levedura de linhagem recombinante L-36 após 36 h de fermentação. Já Santana (2007) obteve eficiência de 89% na fermentação de mosto de amido de mandioca hidrolisado por enzimas do malte de trigo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto Curvelo-Santana et al. (2010) obtiveram 88% de eficiência na fermentação de hidrolisado de farelo de mandioca, utilizando levedura do mesmo gênero.

A eficiência de processo fermentativo, ao se considerar 30 h de fermentação foi de 76,45, 76,37, 82,40 e 79,86% para os meios HASN, HACN, HESN e HECN,

respectivamente. Estes valores são inferiores ao apresentado por Leonel e Cereda (1998), que chegaram a obter eficiência do processo fermentativo de 86,89% em relação ao teor de glicose no mosto inicial. Costa (2010) obteve eficiência de processo de 77,91% e teor alcoólico de 8,1°GL para o processo de fermentação do hidrolisado ácido de farinha de mandioca, enquanto Oliveira (2011) relata 50,59% de eficiência de processo após 12 h de fermentação do hidrolisado de farelo de mandioca.

Os maiores valores de P_E e η_p (%) apresentados pelas fermentações dos meios à base de hidrolisado enzimático frente aos meios à base de hidrolisado ácido, indicam que a hidrólise enzimática fornece um meio com melhores condições para as leveduras. No entanto, quando se compara estes parâmetros com os obtidos na fermentação em meio YPD e com alguns encontrados na literatura, verifica-se que estes são inferiores e que ainda podem ser melhorados.

A adição do nutriente comercial na concentração média indicada pelo fabricante não apresentou diferenças significativas nas eficiências de fermentação e na produtividade em etanol. Vale ressaltar que a dosagem de nutriente indicada pelo fabricante é baseada pelas características do mosto de cana. Esse fato pode justificar os baixos resultados conseguidos com a complementação nutricional dos meios.

Comparando os ensaios de fermentação em estufa com os ensaios no *shaker*, verifica-se que o tempo de fermentação foi menor nos ensaios em *shaker*, fato que destaca a agitação como um fator importante na redução do tempo de fermentação.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que a farinha de mandioca pode ser empregada no processo de produção de etanol, visto que os hidrolisados obtidos demonstraram ser meio adequado para a levedura utilizada.

A determinação de amido da mistura das farinhas ratificou a presença de amido em alta concentração, 76,72%, estando de acordo com valores apresentados na literatura.

A hidrólise da farinha de mandioca gerou açúcar suficiente para as fermentações. Entre os tratamentos de hidrólise empregados, o tratamento enzimático apresentou melhores resultados de rendimento de hidrólise, $98,02 \pm 0,26$, enquanto o tratamento ácido apresentou rendimento de $80,15\% \pm 0,78$.

Os ensaios preliminares de fermentação mostraram que a levedura empregada nas fermentações teve boa adaptação aos meios, apresentando consumo de substrato e produção de etanol satisfatórios.

As fermentações em batelada simples, com *Saccharomyces cerevisiae*, dos meios à base de hidrolisado de farinha de mandioca, mostraram ao final do processo quantidade de etanol satisfatória, demonstrando bom desempenho da levedura nesses meios. Os maiores teores de etanol foram encontrados nas fermentações dos meios à base de hidrolisado enzimático.

O rendimento das fermentações etanólicas esteve perto dos 80%, se apresentando superior a alguns rendimentos apresentados na literatura, porém alguns autores apresentam rendimentos superiores. Assim, verifica-se que as fermentações desses meios ainda podem ser melhoradas de modo a se obter maiores rendimentos.

A complementação dos meios de fermentação com nutriente comercial na quantidade média indicada pelo fabricante não se mostrou suficiente para aumentar significativamente os parâmetros da fermentação.

Portanto, a produção de etanol a partir de farinha de mandioca se mostrou factível e promissora, podendo contribuir com a matriz energética das regiões de baixa renda e vocacionadas para a cultura de mandioca, além de agregar valor a sua cadeia produtiva, levando desenvolvimento para essas regiões.

7 SUGESTÕES

Embora o processo desenvolvido neste trabalho tenha apresentado potencial de aplicação tecnológica, muito ainda precisa ser investigado e aprimorado. Desta forma, algumas sugestões para trabalhos futuros são elencadas a seguir:

- Avaliar a composição geral dos hidrolisados visando a complementação nutricional mais adequada do mosto e, conseqüentemente, seu enriquecimento e melhores rendimentos de fermentação;
- Avaliar a complementação nutricional em quantidades variadas, assim como a complementação dos meios de fermentação com outros nutrientes;
- Realizar um planejamento experimental visando estabelecer condições ótimas de fermentação;
- Avaliar o potencial de outras matérias-primas amiláceas além da farinha de mandioca;
- Realizar simulação do processo, bem como o desenvolver estudo de viabilidade econômica. Além disso, realizar levantamento mais aprofundado, incluindo análise de mercado, sobre toda cadeia produtiva, incluindo os problemas de logística associados à localização da matéria-prima (mandioca).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T. E.; KRISHNASWAMY, C.; RAMAKRISHNA, S. V. Effect of hydrolysis conditions of cassava on the oligosaccharide profile and alcohol fermentation. **Starch/Stärke**, Trivandrum, India, v. 39, n. 7, p. 237-240, 1987.
- ABUD, A. K. de S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica de amiláceos**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- AGU, R. C. et al. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. **Waste Manag.**, Edinburgh, v. 17, n.1, p. 91-96, 1997.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical Engineering**, 2. ed. New York: Academic Press, 1973. 434 p.
- ÁLCOOL de mandioca atrai investimentos. **Revista Abam**, Paranaíba, v. 5, n. 13, p. 8-10, jan./mar. 2006. Disponível em: < <http://www.abam.com.br/revista/revista13/alcooldemandioca.php>>. Acesso em: 13 jun. 2012.
- AMIDOS: fontes, estruturas e propriedades fundionais. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, n. 63, p. 26-37, jul./ago. 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/124.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2012.
- ANDRADE, M. O.; LIMA, U. A. Tecnologia dos alimentos glusídicos. In: CAMARGO, R. (Coord.). **Tecnologia dos produtos agropecuários: alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984. cap. 8.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3.
- AUGUSTINI, D.; JUNIOR, H. E. Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural. **Synergismus scyentifica UTFPR**, Pato Branco, v. 2, n. 1-4, nov. 2007. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/view/191/14>>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- BALL, S. G., MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, n. 1, p. 207-233, jun. 2003.
- BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO; CENTRO DE GESTÃO E ESUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.**, 2008. 316 p.
- BENVENGA, M. A. C. **Comparação de técnicas metaheurísticas de otimização no processo de hidrólise do amido de mandioca para obtenção de álcool**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian J. of Physiol. and Pharmac.**, Birmingham, v. 69, n. 1, p. 60-78, 1991.

BIROL, G. et al. Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 8, p. 672-677, jun. 1998.

BISSON, L.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentation. **Am. J. Enol Vitic**, v. 51, p. 168-177, 2000.

BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G.; ROSSETTI, A. G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1559-1565, 2002.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela Ltda, 1992. 223 p.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 36-52, 2005.

_____; _____. URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, mar./abr. 2007.

CAMARGO, R. **Produtos da mandioca**: tecnologia dos produtos agropecuários. São Paulo: Nobel, 1989. p. 258-267.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R.; ALVES, H. S. Mercado de raízes e tubérculos: análise de preços. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 36-44, 2001.

CANOVA, M. D. **Biocombustíveis**: análise de viabilidade econômica de implantação de microdestilarias de etanol no Rio Grande do Sul. 2011. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CARDOSO, C. E. L. **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. 2003. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

CARVALHO, H. H. et al. **Alimentos**: métodos físicos e químicos de análises. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 180 p.

CARVALHO, L. J. C. B. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11., 2005, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: Embrapa, 2005. Disponível em: <
http://www.cpao.embrapa.br/11cbm/_html/palestras/arquivoPDF/palestra_003.PDF>. Acesso em: 8 fev. 2012.

CEREDA, M. P. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 1994. 180 p.

CEREDA, M. P. (Coord.). **Série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 4 v.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. de F. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COLONNA, P.; LELOUP V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **Eur. J. Clin. Nutri.** London, v. 46, n. 2, p. 17-32, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Conjuntura regional: Alagoas**. 2004. Disponível em: <
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/91f41390f8da7a656bb2296de93f0bba.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2012.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA (COPERSUCAR). **Fermentação**. São Paulo, 1987. 434 p.

COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. 1996. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando a obtenção de etanol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, 2010.

CUNHA, S. M. da. **Produção de amido modificado por hidrólise enzimática**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 613-617, jul./set. 2010.

DALLAQUA, M. A. M.; CORAL, D. J. Morfoanatomia. In: CEREDA, M. P. (Coord). **Agricultura: culturas de tuberosas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 2, cap. 3, p. 48-65. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

DARÉ, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

DEMIATE, I. M et al. Avaliação da farinha de mandioca e do fubá de milho como substratos para obtenção de bebida fermento-destilada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 89-93, mai./ago. 1997.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, mai./jun. 2009.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. **LWT – Food Sci. Technol.**, v. 37, n. 7, p. 797-802, 2004.

EDUARDO, M. de P. **Hidrólise enzimática de mandioca e puba para a obtenção de xarope de maltose**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

ELIASSEN, A.C. **Carbohydrates in food**. New York: M. Dekker, 1996, 664p.

EMBRAPA. **A indústria do amido de mandioca**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 201 p. Disponível em:
<http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento_6.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2012.

_____. Mandioca e fruticultura. Disponível em:
<http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-mandioca.php>. Acesso em: 22 mar. 2012.

ESCARPA, A. et al. An approach to the influence of nutrients and other constituents on the resistant starch formation. **Food. Chem.**, London, v. 60, n. 4, p.527-532, Dec. 1997.

FERNANDES, L. P. et al. Produção de amilases pelo fungo *macrophomina phaseolina*. **Revista eletrônica de farmácia**, Goiânia, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FERREIRA, G. B. et al. Characterizing of obtaining process of a manioc spirit. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, p. 2-7, mar. 2005. Edição Especial.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mandioca e derivados**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **World production**. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Acesso em: 8 mar. 2012.

FRANCISCO JÚNIOR, W. E. Carboidratos: estrutura, propriedades e funções. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 29, p. 8-13, ago. 2008. Disponível em:
<<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc/29/03-CCD-2907.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

FRANCO, C. M. L. et al. Propriedades do amido, In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**: propriedades gerais do amido. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v.1, cap. 6, p. 101-133. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

FREITAS, A. C. de; OLIVEIRA, F. de; OLIVEIRA NETO, P. de. Hidrólise do farelo de mandioca por tratamento ácido termopressurizado. In: SEMANA DE BIOTECNOLOGIA, 5., 2009, Londrina. **Anais...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2009. p. 22. Disponível em:
<<http://www.uel.br/eventos/semanabiotec/?content=trabalhos.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE.

Indicadores IBGE: Estatística da produção agrícola. Rio de Janeiro. 2013. 76 p.

Disponível em: <

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201308.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2013.

_____. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro: IBGE, v. 25, n. 12, p. 1-84, dez. 2012. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2013.

_____. **Produção agrícola municipal:** culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, v. 38, p.1-97, 2011. Disponível em:

<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam2011.pdf)>. Acesso em: 19 fev. 2103.

FURIGO JUNIOR, A. **Enzimas e suas aplicações:** cinética enzimática.

Florianópolis: UFSC, 2001. 39 p. Disponível em:

<http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatica.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2012.

GHOOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: batch versus continous systems. **Biotech. Bioeng.**, v. 21, n. 8, p. 1387-1400, 1979.

GONÇALVES, R. S. et al. Produção de etanol a partir da hidrólise ácida do amido da mandioca. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 1., 2007, Pelotas.

Anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. Disponível em:

<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Tecnologias_11_OK/Goncalves_1.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2012.

GONÇALVES, R. S. et al. Determinação do teor de glicose de diferentes acessos de mandioca a partir da hidrólise ácida das raízes. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 69-71, 2009.

GRETSCHMANN, A. S. Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada. In: ENCONTRO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 10., 2009, Ijuí, **Caderno de resumos...** Ijuí: UNIJUÍ, 2009. Disponível em: <

http://www.projetos.unijui.edu.br/matematica/cd_egem/fscommand/CC/CC_61.pdf>. Acesso em: 10 maio 2012.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** São Paulo, 1985. 523 p.

JAMAI, L. et al. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Techn.**, Amsterdam, v. 98, n. 14, p. 2765-2770, 2007.

- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Indicações de aspectos tecnológicos sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. 23 p. (Embrapa Informática Agropecuária. Documentos, 94).
- KIM, S. B.; YUM, D. M.; PARK, S. C. Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicellulose. **Bioresource Tech.**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 289-294, 2000.
- KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Crit. Rev. Plant. Sci.**, Laemmli, v. 19, n. 3, p. 171-226, 2000.
- KUÇUK, M. M.; DEMIRBAS, A. Biomass Conversion Process. **Energy Convers. Mgmt.**, v. 38, n. 2, p. 151-165, 1997.
- LACERDA, L. G. **Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.
- LAIDLER, K. J. **Introduction to the chemistry of enzymes**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1954. 208 p.
- LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648 p.
- LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. G. O biocombustível no Brasil. **Novos estud. - CEBRAP**, São Paulo, n. 78, p. 15-21, jul. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-33002007000200003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 set. 2012.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Uma nova proposta de uso para o farelo de mandioca. **Bol. França - Flash Meio Amb. Agric., Paris**, n. 13, p. 1-2, 1997.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Avaliação técnico-econômica da produção de etanol de farelo de mandioca, utilizando pectinase como enzima complementar. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 1-14, 1998.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: _____. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, p. 11-18.
- LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Amidos resistentes e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 219-226, abr./jun. 2003.
- LOPES, C. H. **Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira**. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1986. 32 p.
- MALACRINÒ, P. et al. The vinification of partially dried grapes: A comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high stress. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 466-472, 2005.

MENEZES, T. J. B. **Etanol o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2011. 488 p.

OBERLING, D. F. **Avaliação ambiental estratégica da expansão de etanol no Brasil**: uma proposta metodológica e sua aplicação preliminar. 2008. 225 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia: Ciência em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

O'HAIR, S. **Cassava**. 1998. Disponível em: <
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/cassava.html#CommonNames>
>. Acesso em: 15 nov. 2011.

OLIVEIRA, K. R. F. **Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

OLIVEIRA, F. de. **Aproveitamento do farelo residual do processamento de fécula de mandioca na produção de bioetanol**. 2011. 84 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2011.

OSTROWSKI, A. P. et al. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR, 1., 2006, Caboriú. **Anais...** Caboriú: Colégio Agrícola de Camboriú; UFSC, 2006. p. 1-21.

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Clifton, n. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PANDEY, A. et al. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers., 2005. 760 p.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M. P. Linamarina e sua decomposição no ambiente. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2000. v. 4, p. 38-47. (Série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas).

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, London, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.

PEREIRA, A. F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

PRETORIUS, I. S.; LAMBRECHTS, M. G.; AND MARMUR, J. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: an overview. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 26, n. 1, p. 53-76, 1991.

PRIMO-YÚFERA, E.; GIL-TORTOSA, C. I.; GARCÍA-BREIJO, F. J. Hydrolysis of corncob lignocellulosic residue from pentose preparation. **Bioresource Tech.**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 1-4, 1995.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press, 1975. p. 62-87.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária da UFPEL, 1996. v. 1.

RIZATO, M.; FELIPE, F. I. Potencial econômico da produção de álcool de mandioca no norte do Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 767-771, 2009.

SAKANO, Y. et al. Enzymatic properties and action patterns of *Thermoactinomyces vulgaris*-amylase. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 46, n. 5, p. 1121-1129, 1982.

SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

SANTOS, A. M. dos. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, 2008.

SARMENTO, S. B. S. **Caracterização da fécula de mandioca (Maninhot esculenta C.) no período de colheita de cultivares de uso industrial**. 1997. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SCHUOFF, I. A. **A cultura da mandioca e a agricultura familiar no Núcleo Lúcia Ivinhema**. 2005. 41 f. Monografia (Pós-Graduação Lato Sensu) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Casas de farinha**: manual de boas prática. Maceió, 2006a. 60 p.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula)**: estudo de mercado SEBRAE/ESPN. [S.l]: SEBRAE/ESPN, 2008. Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/\\$File/NT00039086.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/$File/NT00039086.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2012.

_____. **Manual de referência para casa de farinha**. Maceió, 2006b. 24 p. Disponível em:

<http://sstmpe.fundacentro.gov.br/Anexo/Manual_de_Referencia_para_Casas_de_Farinha.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2012.

SHIGECHI, H. et al. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting

α -amylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 17, n. 3-5, p. 179-187, 2002.

SILVA, C. G. M. da. **Processo biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) em etanol**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, H. A. da. **Mandioca, a rainha do Brasil?** Ascensão e queda da Manihot esculenta em São Paulo. 2008. 168 f. Dissertação (Mestrado em História) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SILVA, J. R. B. Álcool de mandioca. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=3&item=4>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

SILVA, W. B. da; PERALTA, R. M. Caracterização bioquímica de uma enzima extracelular de um fungo termo-tolerante. **Revista Publicatio**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, p. 7-19, 2000.

SOUZA, K. A. de F. D. de; NEVES, V. A. Experimentos de bioquímica. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm>. Acesso em: 23 fev. 2013.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STEHLIK-TOMAS, V. et al. Zn, Cu and Mn enrichment in *S. cerevisiae*. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.

SURMELY, R. et al. Hidrólise de amido. In: Cereda et al. (Coord). **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. Campinas: Fundação Cargill, 2003. v. 3, cap. 15, p. 337-448. (Série Culturas de Tuberosas Latino Americanas).

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch/ Starke**, Trivandrum, v. 37, n. 1, p. 1-5, 1985.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates: Structural complexity and functional diversity. **Critical Reviews in Biotechnology**, Mysore, v. 22, n. 1, p. 65-84, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**: respostas às questões mais frequentes. São Paulo: UNICA, 2007. 68 p.

VASCONCELOS, J. N. de. Influência da complementação do mosto em nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 41-48, 1987.

VASCONCELOS, J. N. de. **Fundamentos teóricos da fermentação contínua**. Rio Largo, AL: IAA-PLANALSUCAR (COONE), 1988.

VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. (Bebidas, v.1).

WARD, O. **Biotechnología de la fermentación**: principios, procesos e productos. Zaragoza: Acribia, 1989. p. 64-67, 233-247.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch**: chemistry and technology. 2. ed. London: Academic Press, 1984. p. 183-247.

WU, H. C. H.; SARKO, A. The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. **Carbohydrate Research, Amsterdam**, v. 61, n. 1, p. 27-40, 1978.