



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

**ESTUDO COMPARATIVO DAS HIDRÓLISES ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE MATÉRIAS  
PRIMAS AMILÁCEAS VISANDO A OBTENÇÃO DE ETANOL.**

por

**MARYLUCE RABELO COSTA**

Maceió-AL – Dezembro, 2010.

**MARYLUCE RABELO COSTA**

**ESTUDO COMPARATIVO DAS HIDRÓLISES ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE MATÉRIAS  
PRIMAS AMILÁCEAS VISANDO A OBTENÇÃO DE ETANOL.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** DESENVOLVIMENTO E PESQUISA DE PROCESSOS REGIONAIS

**LINHA DE PESQUISA:** PROCESSOS BIOQUÍMICOS

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA

MACEIÓ-AL

2010

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária: Lucia Lima do Nascimento**

C837e Costa, Maryluce Rabelo.  
Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas  
amiláceas visando a obtenção de etanol / Maryluce Rabelo Costa. – 2010.  
109 f. : il., tabs., graf.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.  
Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de  
Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 101-109.

1. Etanol. 2. Hidrólise. 3. Amiláceos. 4. *Manihot esculenta*. 5. Farinha de  
mandioca. I. Título.

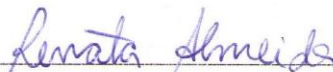
CDU: 661.722: 633.493

**Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias  
primas amiláceas visando a obtenção de etanol**

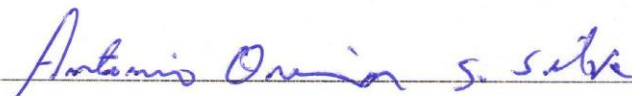
por

**Maryluce Rabêlo Costa**

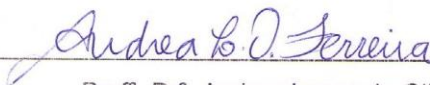
Dissertação defendida e julgada em sua forma final em 16 de Dezembro de 2010,  
pela comissão examinadora, para obtenção de título de Mestre em Engenharia  
Química.



Profª. Drª. Renata Maria Rosa Garcia Almeida - PPGEQ/UFAL (Orientadora)



Prof. Dr. Antônio Osimar Sousa da Silva – PPGEQ/UFAL



Profª. Drª. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira - IFBA

*Eu poderia cair e não levantar. Escrever coisas sem nexos, dizer coisas levianas. Poderia ser outra, poderia ter outro. Eu poderia falar qualquer coisa para qualquer pessoa em qualquer circunstância. Poderia cometer pecados, desrespeitar mandamentos. Usar roupa de oncinha, ouvir música brega. Poderia ser brega. Mais brega. Super brega. Poderia tirar zero, passar vergonha, perder tudo ou nunca ganhar nada. Eu poderia ver as 'videocassetadas' do Faustão. Poderia não ler. Ou só ler a 'Caras'. Ou ler a mão das pessoas. Poderia engordar e cantar numa banda de reggae. Poderia virar dançarina ou cuidar dos porcos perdidos no Haiti. Poderia fazer faxina, fazer pastéis, fazer festas, fazer filhos, fazer teatro, fazer drama, fazer fofoca, fazer média, fazer feio. Poderia não fazer nada. E ainda assim, ele teria orgulho de mim...*

#### **A meu pai (in memoriam).**

*Sem a lembrança, sem o exemplo, sem a saudade, sem esse amor tão grande que sinto, sem essa admiração tão grande que nutro, não conseguiria seguir em frente.*

#### **Mãe...**

*Contigo aprendi que o importante na vida é ser grande. Grande de coração e cabeça. Grande nos sonhos. Grande na hora de repartir e somar. Grande nos pensamentos...*

*"Mainha", você é assim. Grande! Enorme por dentro. Enorme no coração. Enorme no abstrato, no subjetivo... E, como é peculiar das coisas assim, enorme no indescritível, no inenarrável (o que faz com que minhas palavras sejam pequenas demais pra você). AMIGA, incapaz de trair quem quer que seja e, principalmente, incapaz de ir contra seus (lindos) princípios, você me ensinou mais coisas do que imagina. E por isso, e por tudo, sempre será uma referência em minha vida. Orgulho-me de ser tua filha. E, orgulho-me de dizer, amo-te com o coração. Pela sua infinita doçura e bondade. Mas, sobretudo, amo-te com a cabeça. Por sua inteligência e perspicácia. Por suas observações oportunas e pelo modo absolutamente interessante com que você enxerga o mundo. Com seus grandes olhos...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha professora orientadora Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida, pelo voto de confiança e incentivo, mas, sobretudo, por ter acreditado. Por ter estendido a mão num momento de indescritível adversidade. Nunca esquecerei seu gesto...

Ao sempre querido e ilustre professor Evandir Gonçalves de Oliveira, agradeço sua sincera amizade, compreensão e imensa sabedoria. As trocas de idéias, discussões e seus conselhos contribuíram muito para o meu crescimento. Meu respeito e admiração ultrapassam o tempo e espaço.

À amiga, professora e técnica do Laboratório Tecnológico de Bebidas e Alimentos- LTBA, Margarete Cabral, agradeço toda a amizade, companheirismo, atenção, disposição de ensinar e transmitir seu conhecimento sem esforços.

Aos meus irmãos, gostaria de agradecer os incentivos e conselhos constantes, além de todos os esforços na vida em ajudar a construir a pessoa que sou. Não poderia deixar de agradecer seu respeito e carinho transmitidos nessa minha jornada.

Aos meus amigos, não poderia citá-los em ordem de importância, pois cada um contribuiu de formas diferentes, mas igualmente importantes, por isto decidi fazê-lo em ordem alfabética. Muito obrigada Adelma, ('tia') Anete, Aryel, Bel, Edu, Lúcia Santa Ritta, Melke, Suely e Shirley, pelo apoio, respeito, paciência e ajuda.

Ao aluno Janderson da Silva Marques, pelo carinho e gentileza, pelas contribuições técnicas e pelo constante incentivo durante a realização do presente Projeto de Mestrado.

Aos alunos de iniciação científica do LTBA, pelo apoio, humildade, carinho, disponibilização e dedicação durante essa trajetória.

Aos professores da banca examinadora Andrea Lopes de Oliveira Ferreira e Antônio Osimar Sousa da Silva.

A todos que me ajudaram, despretensiosa e incondicionalmente. A todos que trabalham em silêncio e sem alarde pelo alívio do sofrimento do outro; aos que, como eu, sonham com um tempo de maior justiça e leveza humanas...

## RESUMO

Realizou-se comparativo das hidrólises ácida e enzimática do amido no processo de obtenção de etanol a partir da farinha de mandioca como matéria-prima amilácea. A produção de etanol representa uma alternativa ecologicamente correta para substituição de combustíveis de petróleo. O etanol pode ser produzido a partir de matérias-primas açucaradas e amiláceas. A mandioca constitui-se importante produto agrícola, e por apresentar elevado teor de amido pode ser transformado, posteriormente, em glicose para a produção de etanol. A primeira etapa deste trabalho consistiu na caracterização da matéria prima, empregando análises físico-químicas em farinhas de três variedades distintas de mandioca, cultivadas no Município de Junqueiro, localizado no Estado de Alagoas. Na segunda etapa, fez-se um estudo da viabilidade celular de três tipos de leveduras, duas linhagens selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cedidas pelo Centro de Ciências Biológicas- CCBI da Universidade Federal de Alagoas, além da levedura comercial Fermento Biológico *Fermix*. Na última etapa foram realizados 18 ensaios em erlenmeyers, subdivididos em nove ensaios envolvendo a hidrólise ácida e nove ensaios enzimáticos visando a produção de etanol. Os mostos fermentados resultaram em teores alcoólicos 7,5°GL e 8,3°GL para os hidrolisados ácidos enquanto os hidrolisados enzimáticos forneceram valores entre 10,7°GL e 11,6°GL. De acordo com esses resultados, observou-se uma vantagem da utilização de enzimas no processo de hidrólise. Entretanto, vale ressaltar a relação custo-benefício no emprego de ácido nessa etapa do processo de fermentação. A melhor variedade de farinha de mandioca foi a variedade-SE. Apesar da menor quantidade de amido, sua eficiência de conversão foi adequada para realização da fermentação para os três tipos de leveduras estudadas. As leveduras do tipo C3(12) e C1 (10) foram melhores que o fermento comercial quando o teor alcoólico estava superior a 10 %, mostrando maior resistência a intoxicação pelo etanol. Os dados obtidos servem de base para outras pesquisas, visando o aperfeiçoamento deste processo. A busca de fontes de enzimas mais baratas e processos mais aperfeiçoados que diminuam os custos da hidrólise são pontos fundamentais para viabilizar a produção de etanol a partir de material amiláceo.

**Palavras- chave:** Hidrólise; amiláceos; farinha; *Manihot esculenta*; etanol.

## ABSTRACT

The work presents a comparative study about acid and enzymatic hydrolysis of starch to produce ethanol using cassava flour as raw material. Ethanol production represents an alternative to environmentally friendly replacement for fuels from petroleum derivatives. Ethanol can be produced from raw starchy and sugary. Cassava is an important agricultural product in Brazil. It's high starch content, which can be turned into glucose, can be used as feedstock for ethanol production. In this work the first step was to characterize the raw material, employing physical-chemical analysis in flours of three different varieties of cassava grown from Junqueiro, State of Alagoas. The second stage was a study of cell viability of three types of yeast. It was selected two selected strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, donated by the Biological Sciences Center of Federal University of Alagoas - CCBI, and a commercial yeast, Biological *Fermix*. In the last stage, tests were performed in 18 flasks, which were divided into nine trials involving acid hydrolysis and nine trial of enzymatic assays aimed producing ethanol. The musts fermented presented alcoholic strength of 7.5 ° and 8.3 ° GL for acid hydrolyzed while enzymatic hydrolysates achieved values between 10.7 ° and 11.6 ° GL. According to these results, it can observed an advantage of using enzymes in hydrolysis process. However, it is worth the cost-effectiveness in the use of acid in this stage of the fermentation process. The best variety of cassava flour was the variety-SE, despite the lower amount of starch. It's conversion efficiency was adequate for completion of fermentation for the three types of yeast studied. The yeast-type C3 (12) and C1 (10) were better than commercial yeast when the alcohol content was above 10%, showing more resistance to ethanol intoxication. The data obtained is a basis for further research, aiming to improve this process. The search for cheaper sources of enzymes and processes developed further decreasing the costs of hydrolysis are key to enable the production of ethanol from starchy materials.

**Keywords:** *Hydrolysi; starch; flour; Manihot esculenta; ethanol.*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma resumido das etapas de processamento da farinha de mandioca
- Figura 2.** Plantação de Mandioca
- Figura 3.** Tubérculos
- Figura 4.** Mandioca descascada
- Figura 5.** Ralador de mandioca
- Figura 6.** Prensagem da mandioca ralada
- Figura 7.** Mandioca prensada
- Figura 8.** Reservatório de manipueira
- Figura 9.** Esfarelamento da farinha
- Figura 10.** Farinha peneirada
- Figura 11.** Farinha
- Figura 12.** Forno de secagem
- Figura 13.** Empacotamento
- Figura 14.** Armazenagem
- Figura 15.** Estrutura da amilose [polímero linear composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4)]
- Figura 16.** Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6)]
- Figura 17.** Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*
- Figura 18.** Levedura Comercial
- Figura 19.** Lâmina de Microscopia
- Figura 20.** Subdivisões dos Quadrantes
- Figura 21.** Kit GLUCOX

**Figura 22.** Oxidação de 4-aminoantipirina

**Figura 23.** Ebuliômetro

**Figura 24.** pHmetro

**Figura 25.** Ponto de Equivalência ou Ponto Final da Titulação

**Figura 26.** Soluções de Fehling A e B

**Figura 27.** Solução Diluída

**Figura 28.** Titulação

**Figura 29.** Ponto de *Viragem*

**Figura 30.** Hidrólise da amostra

**Figura 31.** Preparo do xarope

**Figura 32.** Ajuste do pH

**Figura 33.** Crescimento da levedura UPSA C3 (12) em meio sintético

**Figura 34.** Crescimento da levedura UPSA C1 (10) em meio sintético

**Figura 35.** Crescimento da levedura do fermento comercial em meio sintético

**Figura 36.** Consumo de glicose do Fermento Comercial durante a fermentação do hidrolisado ácido da farinha da Variedade-IS

**Figura 37.** Consumo de glicose da levedura C1 (10) durante a fermentação do hidrolisado enzimático da farinha da Variedade-SE

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Rendimento das Matérias-Primas Transformáveis em Etanol (L/t)

**Tabela 2.** Valores de Produtividade e Teor Alcoólico

**Tabela 3.** Comparação nas composições da mandioca, do milho e a da batata.

**Tabela 4.** Agentes de Conservação de Amido

**Tabela 5.** Composição química da farinha de mandioca.

**Tabela 6.** Rendimentos das hidrólises

**Tabela 7.** Teor alcoólico para levedura C3 (12)

**Tabela 8.** Teor alcoólico para levedura C1 (10)

**Tabela 9.** Teor alcoólico para fermento comercial

**Tabela 10.** Teor alcoólico para levedura C3 (12)

**Tabela 11.** Teor alcoólico a levedura C1 (10)

**Tabela 12.** Teor alcoólico para fermento comercial

**Tabela 13.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com a levedura C3 (12)

**Tabela 14.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com a levedura C1 (10)

**Tabela 15.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com o fermento comercial

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	59
Equação 2.	60
Equação 3.	62
Equação 4.	71
Equação 5.	72
Equação 6.	75
Equação 7.	77
Equação 8.	79
Equação 9.	81
Equação 10.	82
Equação 11.	83
Equação 12.	83
Equação 13.	90
Equação 14.	90
Equação 15.	94
Equação 16.	95

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. ETANOL	19
2.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A MATÉRIA-PRIMA	22
2.2.1. MANDIOCA	22
2.2.2. PROCESSAMENTO DA FARINHA DE MANDIOCA	25
2.2.2.1. EQUIPAMENTOS PARA FABRICAÇÃO DA FARINHA	26
2.2.2.2. DESCRIÇÃO DO FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO	27
2.3. AMIDO	34
2.3.1. ESTRUTURA DO AMIDO	35
2.3.1.1. AMILOSE	35
2.3.1.2. AMILOPECTINA	36
2.3.2. GELATINIZAÇÃO E RETROGRADAÇÃO DO AMIDO	37
2.3.3. AMIDOS MODIFICADOS	38
2.4. ENZIMAS	38
2.4.1. ENZIMAS AMIOLÍTICAS, SUA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO	41
2.4.1.1. ALFA-AMILASES	42
2.4.1.2. BETA AMILASES	43
2.5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	44
2.5.1. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO	45
2.5.2. O AGENTE DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	46
2.5.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS LEVEDURAS	47
2.5.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
2.6. PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATÉRIA-PRIMA AMILÁCEA	49
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVO GERAL	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1. MICROORGANISMOS	54
4.1.1. MEIOS DE MANUTENÇÃO	55
4.1.2. DETERMINAÇÃO DE MASSA CELULAR	55
4.1.3. CONTAGEM DE CÉLULAS	55
4.1.4. MEIO YPD LÍQUIDO PARA FERMENTAÇÃO	58
4.2. MATÉRIA-PRIMA	58
4.3. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	59

4.3.1. DETERMINAÇÃO DE AMIDO	59
4.3.1.1. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE AMIDO POR HIDRÓLISE	59
ÁCIDA	
4.3.1.2. CÁLCULO DO FATOR DAS SOLUÇÕES	59
4.3.2. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS) (IAL	60
018/IV)	
4.3.3. DETERMINAÇÃO DE POTEÍNAS (MÉTODO DE KJELDAHL)	61
4.3.3.1. ETAPAS DO PROCESSO	61
4.3.3.2. PROCEDIMENTO	61
4.3.4. DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS ATRAVÉS DO PROCEDIMENTO	63
TOG (TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS)- HORIBA	
4.3.5. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE	64
4.3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO (MÉTODO	66
EBULIOMÉTRICO)	
4.3.6.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	67
4.3.6.2. PROCEDIMENTO PARA AFERIÇÃO DO EBULIÔMETRO	67
4.3.6.3. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DO ETANOL	67
4.3.7. DETERMINAÇÃO DO pH PELO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO	68
4.3.7.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	69
4.3.8. ACIDEZ TOTAL	70
4.3.8.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	70
4.3.8.2. REAGENTES	71
4.3.8.3. PROCEDIMENTO	71
4.3.8.4. CÁLCULOS	71
4.3.9. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES (A.R.) PELO	72
MÉTODO EYNON-LANE	
4.3.9.1. PREPARO DO LICOR OU SOLUÇÃO DE FEHLING	74
4.3.9.2. CÁLCULOS	74
4.3.9.3. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	75
4.3.9.4. REAGENTES	76
4.3.9.5. PROCEDIMENTO PARA PRODUTOS DILUÍDOS, COMO	76
SUCOS E MOSTOS	
4.3.10. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	78
(A.R.T.) PELO MÉTODO EYNON-LANE	
4.3.10.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	79
4.3.10.2. REAGENTES	80

4.3.10.3. PROCEDIMENTO PARA PRODUTOS DILUÍDOS, COMO SUCOS E MOSTOS	80
4.3.11. DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO (UMIDADE) SECAGEM EM ESTUFA A VÁCUO (013/IV-IAL)	81
4.3.11.1 MATERIAL	82
4.3.11.2 PROCEDIMENTO	82
4.3.11.3 CÁLCULO	82
4.3.12 DETERMINAÇÃO DE FIBRAS (MÉTODO DE HENNEBERG, 1864)	82
4.3.12.1 PROCEDIMENTO	83
4.3.12.2 CÁLCULO	83
4.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	83
4.4.1. HIDRÓLISE ÁCIDA	83
4.4.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	84
4.4.2.1. HIDROLISADO DA FARINHA DE MANDIOCA	85
4.4.2. FERMENTAÇÃO ETANÓLICA	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS DE MANDIOCA	87
5.2. VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DAS LEVEDURAS	88
5.3. HIDRÓLISE DA FARINHA DE MANDIOCA	90
5.4. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	91
5.4.1. HIDRÓLISE ÁCIDA	92
5.4.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	93
5.4.3. COMPARAÇÃO ENTRE HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA	94
5.5. ESTUDO DA CINÉTICA DE CONSUMO DE GLICOSE	97
6. CONCLUSÃO	99
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, desde os anos 1970, a produção do etanol representa uma alternativa ecológica geradora de emprego e renda. Os primeiros passos do país rumo à produção de etanol foram dados pós-crise do petróleo com o Programa Nacional do Álcool, *Proálcool*, e um novo *boom* de crescimento da produção de etanol ocorreu a partir de do início dos anos 2000 com a introdução dos veículos bicombustíveis no mercado brasileiro.

Em períodos anteriores, já houve iniciativas para a utilização de diferentes matérias primas para a fabricação de etanol no Brasil. Em decorrência do colapso da economia mundial em 1929 e da II Guerra Mundial em 1945, a partir de 1932 o Brasil passou a buscar alternativas para o suprimento da demanda por energia, passando a mandioca a ser matéria-prima para tal finalidade.

Uma nova forma de aproveitamento da mandioca está ganhando força no Norte do país: a produção de etanol. Seis dos dez maiores municípios produtores do tubérculo do Brasil estão nessa região, onde a maior parte do cultivo é realizada em pequenas propriedades, de acordo com o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Até hoje, entretanto, não há, nessa porção do país, um modelo de negócio sustentável para os agricultores voltados à cultura.

Essa realidade começa a mudar com ações do *Programa Bioálcool*, iniciativa do Instituto Ecológica, uma Oscip - Organização da Sociedade Civil de Interesse Público que desenvolve planos de orientação a pequenos produtores nortistas, em sua maioria assentados de reforma agrária, na tentativa de reduzir os efeitos das mudanças climáticas. Para colocar o projeto em prática, duas usinas estão em fase final de construção: uma em Porto Nacional, Tocantins, e outra em Botucatu, São Paulo. A ideia é que no parque tecnológico do Sudeste, que possui capacidade máxima para produzir seis mil litros de etanol por dia, sejam realizadas pesquisas que, sob a coordenação Unesp - Universidade Estadual Paulista servirão de modelo para a usina da região Norte.

A mandioca constitui-se importante produto agrícola, destacando o país como o segundo maior produtor mundial (*Food and Agriculture Organization*, 2006). Por apresentar elevado teor de amido, que posteriormente pode ser transformado em glicose, a mandioca também pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol.

A primeira fase do *Proálcool*, em 1975, tinha como objetivo a produção de etanol de diferentes matérias-primas, apresentando-se a mandioca como um dos produtos potenciais. Além disso, outro objetivo era o de viabilizar projetos de menor porte, podendo ser alternativa energética no meio rural. Naquele período, seis usinas de álcool a partir de mandioca foram criadas no Brasil, porém, por terem sido instaladas em regiões não tradicionais em termos de produção de mandioca, os projetos se tornaram inviáveis (MACHADO & JOB, 2006).

Estes projetos perderam sua competitividade também em virtude dos poucos investimentos em pesquisa, por parte dos setores público e privado.



Atualmente, diante da busca por combustíveis renováveis e não poluentes, voltou a se discutir a viabilidade de novas matérias-primas para a produção de álcool, merecendo destaque o milho nos Estados Unidos e outras matérias-primas na América Latina, Ásia e África. Nestas últimas regiões, a mandioca passou a ser pauta de discussão novamente.

A utilização da mandioca como fonte de carboidratos para produção de etanol sempre foi considerada tomando-se como referencial a cultura da cana de açúcar a qual concorre com vantagens nada desprezíveis. De um lado uma cultura predominantemente de utilização na alimentação na forma “in natura” ou como farinha atendendo extensas populações e de outro uma cultura praticada intensivamente para produção de açúcar que, suprimindo a demanda interna, acessa importantes mercados de exportação.

O Brasil destaca-se como um dos principais produtores de álcool no mundo, com uma produção de 15,9 milhões de m<sup>3</sup> em 2006 (União da Indústria de Cana-de-Açúcar – UNICA, 2007) tendo como matéria-prima a cana-de-açúcar, a qual em 2005 alcançou a produção de 422,9 milhões de toneladas. Para efeito de comparação, no mesmo período, a produção nacional de raízes de mandioca foi de 25,8 milhões de toneladas.

A produção de álcool etílico a partir da farinha da mandioca acena como uma alternativa para transformar o resíduo amiláceo em co-produto, gerando para a indústria não só receita como todos os benefícios mercadológicos de uma indústria limpa. Acredita-se que as vantagens da utilização da mandioca para a fabricação de álcool se dariam principalmente para a melhoria na distribuição de renda em regiões de baixa densidade populacional, podendo contribuir para o desenvolvimento da cultura em regiões de solos de baixa produtividade. Entretanto, as etapas que envolvem a hidrólise do amido nas matérias primas amiláceas ainda são tidas como um obstáculo a ser vencido na produção de etanol, tendo em vista os custos das enzimas envolvidas no processo, bem como as condições operacionais do mesmo. Assim, a presente dissertação de Mestrado estabelece um estudo comparativo dos meios de hidrólise conhecidos, visando uma redução dos custos de produção.

No capítulo Revisão Bibliográfica é apresentado um histórico da produção de etanol ao longo dos anos, destacando os avanços na produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas. Em materiais e Métodos são descritos os microrganismo, meios de cultura, equipamentos, bem como as técnicas e metodologias utilizadas na obtenção e no tratamento dos resultados experimentais.

No capítulo de Resultados e Discussões são avaliadas as etapas da metodologia aplicada ao longo dos ensaios experimentais e a estabilidade das linhagens selecionadas frente a um processo fermentativo em relação à levedura comercial, ante as diferentes formas de otimização do processo de produção de etanol.

O capítulo de conclusões enfatiza os resultados mais significativos, bem como as sugestões para o prosseguimento deste trabalho. Finalmente, o capítulo Referências Bibliográficas relaciona os trabalhos e publicações mencionados ao longo desta 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  $C_2H_5-OH$ . O álcool 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 (LIMA et al., 2001).

A utilização do etanol 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.

De 1975 a 1979, o programa começou aumentando a mistura de etanol na gasolina. Em sua segunda fase, de 1979 a 1985, o programa evoluiu e passou a fomentar o uso do etanol como combustível principal com carros movidos a álcool, aumentando substancialmente sua participação na matriz energética nacional.

A partir da segunda metade da década de 80, alguns problemas começaram a afetar a credibilidade do programa. Com a dificuldade dos produtores para suprir a aquecida demanda por etanol, combinado com a queda do preço do petróleo, que baixou os preços do barril, o combustível deixou 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 mortalmente o programa. Sem perspectiva de continuidade, o programa passou gradualmente ao esquecimento que culminou na saída do Estado durante a década de 90 com uma forte desregulamentação do setor sucroalcooleiro. Dessa forma, o etanol ficou renegado ao segundo plano até o início do século XXI (OBERLING, 2008).

Quimicamente, o álcool hidratado não apresenta diferenças quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o etanol, 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).

A indústria alcooleira no Brasil sempre funcionou 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 álcool. Em consequência da crise energética que o mundo atravessa, o panorama atual é diferente, colocando a agroindústria entre as mais importantes, principalmente após a oficialização do Programa Nacional do Álcool, em 1975 (STUPIELLO, 1978). Embora todo produto agrícola rico em carboidratos transformáveis em álcool (sacarose, glicose, amido, celulose, etc.) possa ser considerado matéria-prima para a fermentação alcoólica, é imprescindível considerar alguns pontos fundamentais, como condições de cultivo, custo aquisitivo, facilidade de transformação, rendimento em álcool, disponibilidade durante ano, etc.

De acordo com Stupiello (1978), 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.

A Tabela 1 mostra os rendimentos obtidos por algumas destas matérias primas, em litros por tonelada.

**Tabela 1.** Rendimento das Matérias-Primas Transformáveis em Etanol (L/t)

<i><b>Matéria - Prima</b></i>	<i><b>Etanol (L/t)</b></i>
Melaço de cana-de-açúcar	300 - 380
Cana-de-açúcar	60 - 75
Sorgo Sacarino (colmo)	60 - 75
Sorgo Sacarino (grãos)	350 - 400
Mandioca	150 - 180
Coco de babaçu	70 - 80
Batata Doce	120 - 130

FONTE: SAWADA, 1979

Ao comparar esses dados, verifica-se que o rendimento de álcool por unidade de massa de matéria-prima é, substancialmente, mais elevado nas amiláceas ou fuculentas que nas açucaradas, com exceção do melaço.

De acordo com a Tabela 2, os valores médios de produtividade agrícola e teor de carboidrato transformáveis em álcool, para algumas matérias-primas, são da seguinte ordem:

**Tabela 2.** Valores de Produtividade e Teor Alcoólico

	<b><i>Produtividade Agrícola</i></b> <b><i>(t/ha)</i></b>	<b><i>Açúcares Totais</i></b> <b><i>(%)</i></b>
Cana-de-açúcar	60	16
Sorgo Sacarino (colmo)	25	14
Mandioca	12	30
Batata Doce	15	25
Milho	0,4	65
Coco de babaçu	8	15

FONTE: SAWADA, 1979

Na opinião de Jackson (1976), a cana-de-açúcar e a mandioca são matérias-primas que se complementam para fabricação de álcool, porque a cultura de mandioca é viável em terras que não se prestam à lavoura canavieira, podendo as duas culturas coexistir e expandir sem a interferência de uma na outra. Além disso, as unidades industriais mistas, desde que sejam bem programadas, aumentariam o período de utilização da planta industrial, reduzindo os custos de manutenção ociosa.

A produção de etanol por fermentação de substratos amiláceos vem sendo objeto de intensas pesquisas que buscam aperfeiçoar a conversão destes materiais de um modo mais rápido e a menores custos. Atualmente, o Brasil já possui uma matriz energética com significativa participação de energias renováveis, tendo acumulado importante experiência na produção de álcool como combustível.

A ampliação da participação da biomassa, a partir do desenvolvimento de fontes amiláceas, especialmente da mandioca, poderá promover uma reperspectivação dos complexos agroindustriais em direção aos pequenos empreendimentos, ampliando as políticas de cunhos social, ambiental e econômico nas comunidades agrícolas e de base familiar.

Além de uma nova iniciativa, será também um modo de produzir álcool com menor teor de impurezas, podendo destinar-se à indústria farmacêutica e de bebidas, promovendo o aumento de novos investimentos, empregos, renda e desenvolvimento tecnológico, além de poder atender parte da crescente demanda mundial por combustíveis de reduzido impacto ambiental. (SALLA & CABELLO, 2008).

## 2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A MATÉRIA PRIMA

### 2.2.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma planta arbustiva, com um ciclo de vida longo, típica do continente americano e apresenta mais de 300 variedades. O Brasil possui aproximadamente 2 milhões de hectares destinados ao cultivo da mandioca e é o segundo maior produtor mundial, com produção anual de 23 milhões de toneladas de raízes frescas, perdendo apenas para a Nigéria. O rendimento da produção está entre 12 e 25 t/ha (NATURAL COMUNICAÇÃO, 2008).

Na América existem evidências diretas e indiretas do cultivo da mandioca que datam de até 2.500 a.C, e é provável que sua domesticação tenha ocorrido no nordeste da América do Sul (SAUER, 1993). Portanto, a mandioca, quando a chegada do europeu, já era cultivada na região tropical do Novo Mundo há pelo menos quatro ou cinco mil anos (ADAMS et al., 2006; DEAN, 1996; SAUER, 1993). No Brasil, o papel desta cultura tem sido particularmente importante, ocupando um lugar de destaque na formação socioeconômica e cultural do país. Ainda hoje é parte obrigatória da alimentação de vários segmentos da população brasileira, especialmente nas áreas rurais (CASCUDO, 2004; ADAMS et al., 2006; BARGHINI, 2004; PINTO & SILVA, 2005).

A maior parte da produção de mandioca tem origem nas pequenas propriedades agrícolas, situada em áreas econômica e ecologicamente marginais e cultivada por meio de práticas agrícolas rudimentares (ADAMS et al., 2006). Cultivada em regiões de clima tropical e subtropical, a mandioca teve seu maior desenvolvimento nos estados do Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Tem baixa resistência ao frio - temperaturas inferiores a 15°C prejudicam o desenvolvimento da planta – mas pode ser plantada em altitudes que variam entre o nível do mar e até 1.000 m. A cultura da mandioca é de fácil propagação, pois é tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. Solos arenosos ou permanentemente alagados não são adequados ao cultivo da mandioca, sendo mais adequados os profundos de boa drenagem.

A produção de plantas amiláceas supre 4/5 da demanda mundial de alimentos em termos de calorias (SARYKAYA et al., 2000). A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), uma raiz com alto conteúdo de amido, apresenta mais de trezentas variedades e é originada do continente americano, provavelmente Brasil, América Central ou México. Pertence à família das Euforbiáceas, a mesma da mamona seringueira, coroa-de-cristo e flor de papagaio (CEREDA, 2001). Nove países produzem 80% das 168 milhões de toneladas de mandioca colhidas por ano (Empresa de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, 2002). O maior produtor é a Nigéria, com aproximadamente 33 milhões de toneladas por ano, seguida do Brasil, com 25 toneladas por ano; em seguida aparecem a Tailândia, Congo, Indonésia, Gana, Tanzânia, Índia e Moçambique (EMBRAPA, 2002).

A mandioca é a sexta mais importante planta comestível no mundo (BERGHOFER & SARHADDAR, 1988) e ocupa o quarto lugar em área plantada com mais de 500 milhões de consumidores regulares (CAMARGO, 1985). Apresenta bom rendimento agrícola com 13,5t/ha,

enquanto que o milho produz apenas 3t/ha (IBGE, 2002). A área plantada de mandioca no país é de 1,7 milhões de hectares, enquanto que a do milho é de 12 milhões de hectares que produzem 42 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2002).

A mandioca é freqüentemente cultivada em solos de textura superficial média a arenosa, com baixos teores de nutrientes e de matéria orgânica. O crescimento da mandioca apresenta ciclo de desenvolvimento composto por 5 fases fisiológicas principais, sendo quatro ativas e uma de repouso vegetativo. Na primeira fase, chamada de brotação da maniva, sob condições favoráveis de umidade e temperatura, surgem as primeiras raízes fibrosas após o 7º dia do plantio. Na segunda fase continua sendo formado o sistema radicular, constituído por raízes fibrosas, como o de qualquer outra planta. Esta fase tem duração aproximada de 70 dias. Na terceira fase ocorre o desenvolvimento da parte aérea e tem duração de 90 dias.

Durante essa fase ocorre, simultaneamente, o espaçamento de algumas raízes fibrosas pelo acúmulo de amido. Ressalta-se que, quanto mais tempo a folha da mandioca permanecer na planta, menor quantidade de produtos da fotossíntese será alocada na formação de novos ápices de crescimento e, conseqüentemente, mais energia poderá ser transportada para ser armazenada na raiz de reserva, que será traduzida em maior produtividade de amido.

A quarta fase é o espessamento das raízes de reservas, que corresponde à migração das substâncias de reserva para as raízes de armazenamento que se inicia na fase anterior e acentua-se no 5º mês. Nessa fase já não há mais crescimento das raízes em comprimento, mas em diâmetro, pela deposição do amido. Na quinta e última fase, a chamada fase de repouso, a planta perde a folhagem naturalmente, encerrando a sua atividade vegetativa, permanecendo apenas a migração das substâncias de reserva para as raízes. É durante essa fase que a planta de mandioca armazena o máximo de reserva de amido nas raízes. Recomeça após esse período de repouso, uma nova fase de crescimento, quando é reiniciada a formação das ramas e folhas, que, inicialmente, acontece à custa do amido armazenado nas raízes e ramas durante a fase de crescimento anterior (TERNES, 2002).

As raízes de mandioca apresentam uma composição média de 68,2% de umidade, 30% de amido, 2% de cinzas, 1,3% de proteínas, 0,2% de lipídeos e 0,3% de fibras (ALBUQUERQUE et al., 1993). As raízes de mandioca são, portanto, essencialmente energéticas, apresentando elevados teores de carboidratos, principalmente polissacarídeos. A composição da mandioca varia muito 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 (PARK et al., 1971). O amido de mandioca é o mais suscetível à ação da enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana, provavelmente devido à sua temperatura de gelatinização (58-75°C) e porque os grãos de amido da mandioca possuem uma estrutura interna fracamente ligada.

**Tabela 3.** Comparação nas composições da mandioca, do milho e a da batata.

<b>%</b>	<b>Mandioca<sup>1</sup></b>	<b>Milho<sup>2</sup></b>	<b>Batata<sup>2</sup></b>
Amido	90,1	70,9	76,0
Proteína	1,5	9,8	8,0
Fibra	5,6	2,6	6,4
Gordura	0,3	4,8	0,5
Açúcares	0,7	2,6	4,4
Cinzas	1,8	1,4	4,7
Outros	-	7,9	-

<sup>1</sup> MENDES (1992)

<sup>2</sup> DZIEDZIC & KEARSLEY (1984)

De acordo com a Tabela 3, a mandioca é uma matéria-prima adequada para obtenção, por hidrólise, de diversos derivados. Também é possível observar que, em relação às outras amiláceas citadas, a mandioca apresenta elevado teor de amido e baixos teores de gorduras, proteínas e cinzas (KEARSLEY & TABIRI, 1979). Além disso, o amido de mandioca é mais suscetível à ação da  $\alpha$ -amilase bacteriana do que o milho, provavelmente devido à sua temperatura de gelatinização ser mais baixa e porque os grãos de amido da mandioca possuem uma estrutura interna fracamente ligada (PARK et al., 1971).

A cultura da mandioca é de fácil propagação, tolerante a pragas e doenças e pouco exigente quanto a condições edafoclimáticas. No entanto, tem baixa resistência ao frio, apresenta um longo período de crescimento e alto potencial de deterioração fora do solo. As mudanças ocorrem após 2 a 3 dias da colheita, devido a processos fisiológicos seguida pela deterioração microbiológica após 5 a 7 dias devido ao elevado teor de umidade (PLUMBLEY & RICKARD, 1991). A conservação, porém, pode ser feita por meio do processamento da farinha, pellets e raspas secas (GHILDYAL et al., 1989) ou, como é muito usual nas pequenas propriedades do Brasil, processando a raiz para obter polvilho, puba, biju, entre outros produtos regionais. Os estudos no sentido de melhoramento da cultura têm sido realizados intensamente e algumas publicações relatam que estão sendo obtidas novas variedades que produzem tubérculos com maior teor de proteína e maior rendimento de amido (JACKSON & ROSENTHAL, 1976).

Para o agronegócio brasileiro, a cadeia produtiva da mandioca tem um papel relevante pela sua ampla utilização em vários setores industriais. É a base alimentar da maioria da população de baixa renda, gerando renda no campo e na agroindústria, para cerca de 860 mil pessoas, e valores de 200 milhões de reais.



Para a indústria de transformação, estima-se que as gerações de receitas em conjunto somem 2,5 bilhões de dólares/ano, sendo o quinto produto agrícola em importância, conseguido com a comercialização da raiz, farinhas, féculas e outros derivados. A cultura da mandioca requer baixo custo de oportunidade, é um grande gerador de emprego no campo (estimada de 0,5 homem/ha de área plantada), em todas as etapas da cadeia produtiva (GONÇALVES et al., 2009).

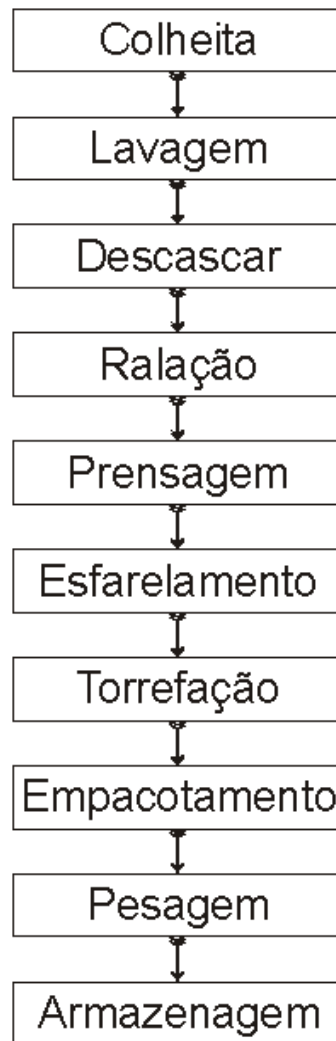
Esta planta vem desempenhando um papel importante desde os primórdios, não só como fonte de subsistência para muitos povos, mas também como matéria-prima para diversos produtos fermentados. Um produto de fermentação da mandioca, típico da Nigéria é o “gari”, em cujo processamento, os microrganismos predominantes são *Corynebacterium manihot* e *Geotricum cândida*.

No Brasil temos a “tiquira”, uma aguardente de mandioca muito apreciada no Maranhão, cuja fabricação pelos indígenas era feita por processos primitivos. Hoje, uma técnica mais avançada é usada, reduzindo ao mínimo o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis. (SAWADA, 1979). Os principais fungos identificados por Lima (1943), como responsáveis pela sacarificação do amido na elaboração da “tiquira” são *Aspergillus níger*, *Penicillium pupurogenum* e *Monilia citophila*. Além da “tiquira”, temos ainda alguns alimentos obtidos pela fermentação de mandioca, como “farinha d’água” e “polvilho azedo”, e bebidas alcoólicas conhecidas no Nordeste como “vicou”, “caissuma”, “cachiri” e “voua paia”.

### **2.2.2 Processamento da Farinha de mandioca**

A farinha constitui um dos principais produtos da mandioca, e seu uso é muito difundido em todo o país, fazendo parte da refeição diária de muitos brasileiros. É um alimento rico em carboidratos e fibras e, quando integral, contém um pouco de proteína, cálcio, fósforo, sódio e potássio. A tecnologia de fabricação da farinha é simples, mas exige alguns cuidados no seu desenvolvimento. A seleção da matéria-prima adequada, a higiene e os cuidados durante todo o processo de fabricação, são fatores fundamentais para garantir um produto de qualidade.

O rendimento médio é de 25 a 30%, dependendo da variedade de mandioca e da eficiência dos equipamentos utilizados. Para a fabricação da farinha de qualidade, o produtor precisa observar os procedimentos recomendados para o processamento de alimentos: localização adequada da unidade de processamento, utilização de medidas rigorosas de higiene dos trabalhadores na atividade; limpeza diária das instalações e equipamentos; matéria prima de boa qualidade; tecnologia de processamento, embalagem e armazenagem adequados ([www.engetecno.com.br/port/tecnologia\\_farinha\\_de\\_mandioca](http://www.engetecno.com.br/port/tecnologia_farinha_de_mandioca)). A Figura 1 mostra o fluxograma das etapas de processamento da farinha de mandioca.



**Figura 1.** Fluxograma resumido das etapas de processamento da farinha de mandioca

#### **2.2.2.1 Equipamentos para fabricação da farinha**

Os equipamentos necessários para a fabricação da farinha de mandioca estão listados a seguir:

- Lavador;
- Ralador;
- Prensa;
- Tanque para esfarelamento da massa;
- Fornalha com queimadores independentes;
- Estrado para classificação e empacotamento;
- Cubas plásticas
- Balança mecânica.

### 2.2.2.2 Descrição das etapas de processamento

#### ➤ **Colheita da mandioca**

As raízes de mandioca, para fabricação de farinha e polvilho, são colhidas com a idade de 16 a 20 meses, entre abril e agosto, na região Nordeste, pois apresentam o máximo de rendimento. O processamento deve acontecer logo após a colheita ou no prazo máximo de 36 horas, para evitar perdas, escurecimento, resultando em produto de qualidade inferior, pois logo após a colheita, inicia-se o processo de fermentação das raízes. Devem ser evitados atritos e esfolamentos das raízes, o que provocaria o início da fermentação, também resultando em produto de qualidade inferior.

A Figura 2 mostra uma plantação de mandioca do município de Junqueiro durante o período de colheita.



**Figura 2.** Plantação de Mandioca.

#### ➤ **Lavagem e descascamento**

As raízes devem ser lavadas para eliminar a terra aderida à sua casca e evitar a presença de impurezas que prejudicam a qualidade do produto final. O descascamento elimina as fibras

presentes nas cascas, as substâncias tânicas, que escurecem a farinha, e parte do ácido cianídrico que se concentra em maior proporção nas entrecasas.

A Figura 3 mostra os tubérculos de mandioca, já lavados e descascados, prontos para o processo de ralagem.



**Figura 3.** Tubérculos.

O descascamento pode ser manual, feito com facas afiadas ou raspador, ou mecânico, utilizando-se do descascador cilíndrico ou em forma de parafuso. Após o descascamento manual, as raízes devem ser novamente lavadas para retirar as impurezas a elas agregadas durante o processo. Um adulto descasca, em média, 250 kg de raízes de mandioca em 8 horas de trabalho.

No descascador mecânico, a lavagem e o descascamento são feitos ao mesmo tempo, através do atrito das raízes entre si e delas com as paredes do equipamento, com fluxo contínuo de água. A lavagem e o descascamento bem feitos resultam na obtenção de farinha de melhor qualidade.

A Figura 4 mostra as raízes de mandiocas descascadas, seguindo para a etapa de ralação.



**Figura 4.** Mandioca descascada.

### ➤ **Ralação das raízes**

A ralação é feita para que as células das raízes sejam rompidas, liberando os grânulos de amido e permitindo a homogeneização da farinha. A ralação normalmente é feita em cilindro provido de eixo central com serrinhas, como mostra a Figura 5. As serras do cilindro não devem ter dentes tortos, faltantes, gastos ou enferrujados, pois isto interfere no rendimento do produto final. Os dentes das serrinhas se desgastam com o uso, por isso, periodicamente deve-se regular o espaço entre o cilindro e o chassi do ralador. O ajuste do eixo e das polias e a manutenção das serras são indispensáveis para homogeneização da massa, definição da granulometria e aumento do rendimento do produto.

Pontos importantes a serem observados na ralação da mandioca:

- Ajustamento do cilindro;
- Rotação adequada;
- Serrinhas em bom estado;
- Polia.



**Figura 5.** Ralador de mandioca

### ➤ **Prensagem da massa ralada**

A prensagem deve acontecer logo após a ralação, para impedir a fermentação e o escurecimento da farinha. É realizada em prensas manuais de parafuso ou em prensas hidráulicas e tem como objetivo reduzir, ao mínimo possível, a umidade presente na massa ralada para impedir o surgimento de fermentações indesejáveis, economizar tempo e combustível na torração, e possibilitar uma torração sem formação excessiva de grumos. A Figuras 6 e 7 mostram a etapa de prensagem da mandioca após a ralação.



**Figura 6.** Prensagem da mandioca ralada.



**Figura 7.** Mandioca prensada.

A água resultante da prensagem da massa ralada é chamada "manipueira" (Figura 8) e é muito tóxica e poluente. Uma tonelada de mandioca produz cerca de 300 litros de "manipueira". A manipueira precisa receber um tratamento adequado para evitar a contaminação dos rios terrenos vizinhos à unidade de processamento.



**Figura 8.** Reservatório de manipueira.

➤ **Esfarelamento/Peneiração**

Ao sair da prensa, a massa ralada está compactada, havendo necessidade de ser esfarelada para permitir a peneiração. Esse esfarelamento pode ser feito manualmente ou através do esfarelador ou ralador. Em seguida, passa-se a massa na peneira, na qual ficarão retidas as frações grosseiras contidas na massa, chamada “cruera” crua, que podem ser utilizadas na alimentação de animais. O crivo ou malha da peneira vai determinar a granulometria da farinha. A Figura 9 mostra a etapa de esfarelamento da farinha, assim como a Figura 10 ilustra a farinha já peneirada. Já a Figura 11 mostra a farinha pronta para ser torrada em forno de secagem.



**Figura 9.** Esfarelamento da farinha.



**Figura 10.** Farinha peneirada.



**Figura 11.** Farinha.

➤ **Torração**

Após o esfarelamento, a massa é colocada, em bateladas, no forno para eliminação do excesso de água e gelatinar parcialmente o amido, por um período aproximado de 20 minutos. Em seguida, o forneiro agita a massa com o auxílio de um rodo de madeira, de cabo longo e liso. Após essa etapa, a farinha é colocada em pequenas quantidades num outro forno para uniformização da massa e torração final. Os fornos de secagem devem estar localizados em locais com paredes para proteger o forneiro e a farinha contra chuvas e ventos. A torração tem grande influência sobre o produto final, porque define a cor, o sabor e a durabilidade da farinha e deve ser realizada no mesmo dia da ralação das raízes. A Figura 12 mostra o forno de secagem, onde é realizada a etapa de torração da farinha.



**Figura 12.** Forno de secagem.



➤ **Classificação/Empacotamento/Pesagem**

Durante a torração e o resfriamento da farinha, acontece a formação de grumos, devido à gomagem da fécula. Para a obtenção de um produto homogêneo, utiliza-se peneira com crivo que permita a obtenção da farinha com a granulometria desejada, em função das exigências do mercado. O empacotamento é feito em sacos de 45 kg, quando se destina à venda por atacado, e de 0,5 e 1,0 kg para venda no varejo, sendo recomendado o uso de saco plástico ou de papel kraft. A Figura 13 mostra a etapa de empacotamento da farinha após a secagem em forno.



**Figura 13.** Empacotamento.

➤ **Armazenagem da farinha**

A farinha deve ser armazenada em local seco e ventilado, exclusivo para essa finalidade. Os sacos devem estar colocados sobre estrados ou grades e empilhados com espaço entre as embalagens. A área de armazenagem deve ter pisos e paredes laváveis, teto de laje ou PVC e cobertura com telha. Deve ser feito um combate constante a insetos e roedores e ainda, um giro dos estoques, usando-se primeiro o produto mais antigo. A figura 14 mostra o estoque da farinha após todas as etapas de produção.



**Figura 14.** Armazenagem.

### 2.3 AMIDO

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. O material puro pode ser obtido por processos simples a partir de partes de plantas, como sementes, caules e raízes (SHANNON & GARWOOD, 1984). Em alimentos, o amido é o principal constituinte de uma grande variedade de produtos, sendo responsável por sua estrutura, textura e/ou consistência. Nos vegetais, o amido encontra-se em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que o constituem: amilose (de 15 a 30%) e amilopectina (de 70 a 85%).

É um polímero composto de carbono, hidrogênio e oxigênio, nas proporções 6:10:5 ( $C_6H_{10}O_5$ ), podendo ser considerado um produto da condensação de unidades de anidroglicose (SWINKELS, 1985). Ele é constituído de 50% a 65% do peso das sementes de cereais secos, e até 80% da substância seca de tubérculos. O amido é essencialmente constituído de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina, e apresenta-se em forma de grânulos insolúveis em água fria, cujo tamanho e forma são característicos da planta de origem (TAPARELLI, 2005).

O amido constitui a mais importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores, ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos. Ocorre também em algas e, pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido, é um dos elementos mais importantes da alimentação humana. Normalmente está presente na forma de grãos birrefringentes, cuja aparência varia de acordo com a origem. Suspensões de amido em água, por aquecimento formam géis e no processo da gelificação a birrefringência desaparece (BOBBIO, 1989).

Os amidos são utilizados na indústria de alimentos para conferir características funcionais em produtos devido, principalmente, à presença dos polissacarídeos amiloses e amilopectinas que os compõe. A amilose é um polímero de cadeia linear contendo ligações glicosídicas tipo  $\alpha$  1-4,

apresentando peso molecular de  $1,5 \times 10^5$  a  $10^6$  g/mol. As amilopectinas são de cadeia ramificada onde cadeias de 1-4  $\alpha$ -D-glucana possuem conexões axiais tipo 1-6  $\alpha$ -D-glucana a cada 20-25 unidades de glicose da cadeia linear e peso molecular da ordem de  $5 \times 10^6$  a  $10^8$  g/mol (BANKS; GREENWOOD; KHAN, 1971).

Estes dois polissacarídeos estão presentes nos grânulos de amido em diferentes proporções e, em função de suas estruturas moleculares, conferem características de viscosidade, solubilidade, poder de gelificação ou de adesão, e outras mais, diretamente relacionadas à sua origem botânica (MUA; JACKSON, 1997).

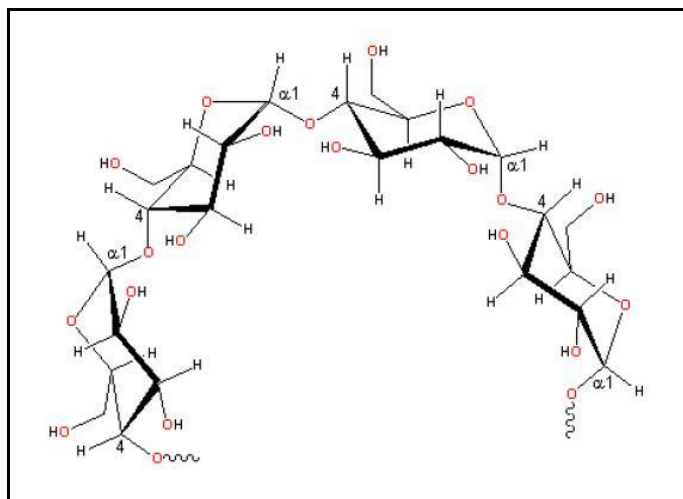
Quimicamente os amidos das mais diversas fontes botânicas são iguais, ou seja, são carboidratos que diferem apenas na composição relativa e organização dos biopolímeros que o compõe (ZOBEL, 1988; HOOVER, 2001). O tamanho e forma do grânulo varia de planta para planta, todos eles diferentes e de procedência conhecida quando examinados ao microscópio. Todos os grânulos possuem um hilo, que constitui o centro de nucleação, ao redor do qual, desenvolve-se o grânulo (WHISTLER & DANIEL, 1986).

### **2.3.1 Estrutura do amido**

Na realidade 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, e mesmo entre amidos provenientes da mesma espécie as proporções de amilose e de amilopectina variam de acordo com o grau de maturação das plantas. As proporções de amilose e amilopectina influem na viscosidade e no poder de gelificação do amido.

#### **2.3.1.1. Amilose**

Amilose é um polissacarídeo linear, formado por unidades de D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), em número que variam de 200 a 10.000. De acordo com a Figura 15, as ligações glicosídicas na configuração  $\alpha$  conferem à amilose uma estrutura helicoidal dentro da qual podem se acomodar moléculas de iodo, formando um composto de inclusão de cor azul intensa. Esta reação é usada na determinação quantitativa de amilose e como indicador da presença de amido. A estrutura helicoidal da amilose é também responsável pela formação de complexos com alguns compostos orgânicos, como alcoóis alifáticos de cadeia não ramificada.



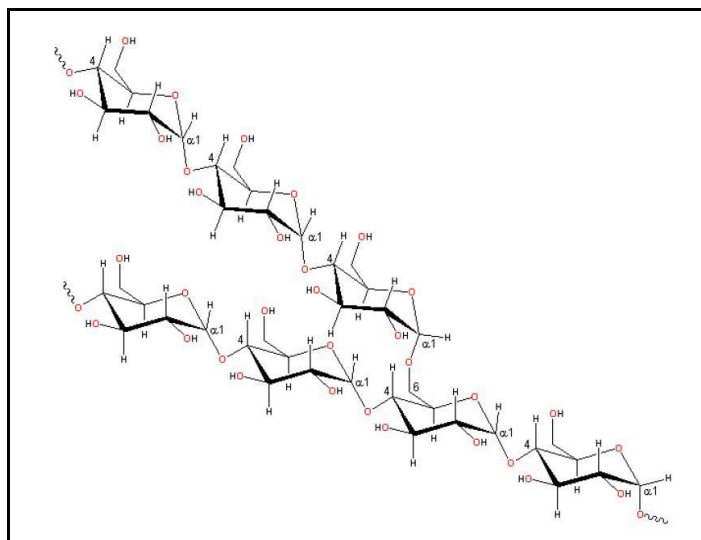
**Figura 15.** Estrutura da amilose [polímero linear composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) adaptado de Lajolo & Menezes. FONTE: DENARDIN, 2008.

A formação do complexo de amilose com n-butanol é um dos métodos para a separação da amilose de uma mistura de amilose e amilopectina. Este composto é também um complexo de inclusão, no qual o n-butanol é envolvido fortemente pela estrutura helicoidal da amilose e, nesse processo, grande quantidade de água de solvatação é deslocada, tornando a amilose muito menos solúvel, e facilmente cristalizável.

Em alimentos, os lipídeos existentes também podem ser envolvidos pelas hélices da amilose do amido presente, o que pode ter influência na digestibilidade do amido (BOBBIO, 1989).

### 2.3.1.2 Amilopectina

Amilopectina constitui a fração altamente ramificada do amido. É formada por várias cadeias constituídas de 20 a 25 unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose unidas em (1-4); essas cadeias, por sua vez, estão unidas entre si por ligações  $\alpha$ - (1-6), constituindo essas ligações de 4 a 5% do total das ligações glicosídicas (BOBBIO, 1989). Sua estrutura, embora não perfeitamente estabelecida, confere à amilopectina uma forma esférica. A Figura 16 mostra a estrutura molecular do polímero ramificado de amilopectina.



**Figura 16.** Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6)] Adaptado de Lajolo & Menezes. FONTE: DENARDIN, 2008.

### 2.3.2 Gelatinização e retrogradação do amido

Quando grãos de amido são suspensos em água e a temperatura é aumentada gradualmente, nada acontece até se atingir uma determinada temperatura, mais exatamente um intervalo de temperatura, que é chamada temperatura de gelatinização. Nesta temperatura, específica para amidos de diferentes origens, as ligações de hidrogênio mais fracas entre as cadeias de amilose e de amilopectina são rompidas e os grãos de amido nessas regiões começam a intumescer e formar soluções consideravelmente viscosas. O intumescimento dos grãos e, portanto, o aumento de viscosidade das soluções está relacionado com a quantidade de água presente; a 120°C todos os grãos estarão dissolvidos.

Quando soluções de amido são resfriadas à temperatura ambiente, ou mesmo temperaturas mais baixas, haverá a formação de géis ou de precipitados microcristalinos, dependendo da concentração das soluções e da velocidade do resfriamento. Soluções concentradas e resfriadas rapidamente tendem a formar géis, enquanto soluções mais diluídas, deixadas em repouso, tendem a precipitar.

Esses precipitados cristalinos são formados devido à tendência para formação de ligações intermoleculares da fração linear, o que não acontece com a amilopectina, na qual essa associação é dificultada pelas ramificações. Esse fenômeno é conhecido como retrogradação do amido, e é acelerado pelo congelamento de suas soluções aquosas. As ramificações da amilopectina, como observado anteriormente, impedem ou dificultam a aproximação dessas cadeias, o que faz com que a amilopectina permaneça em solução. No processo da retrogradação há sempre liberação de moléculas de água anteriormente ligadas às cadeias de amilose, esse fenômeno é denominado sinérese.

### 2.3.3 Amidos modificados

O conhecimento da correlação entre a estrutura molecular e a granular do amido e suas propriedades físico-químicas, levou ao estudo de modificações dessas estruturas a fim de que fossem satisfeitas necessidades com fins especiais, incluindo as necessidades da indústria de alimentos. Além de modificações genéticas, como é o caso do amido de milho com alto teor de amilose, a estrutura química do amido pode ser modificada por métodos químicos ou enzimáticos, com formação de produtos com propriedades diversas do amido natural (BOBBIO, 1989).

## 2.4 ENZIMAS

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Conforme Harger (1982), enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações.

Após a descoberta de que certos microrganismos produzem enzimas, foram desenvolvidos processos técnicos para a produção de enzimas microbianas em escala comercial. Desde essa época, reconhece-se que as enzimas têm composição protéica e são biocatalisadores responsáveis por uma gama de reações que permitem que as células vivas sobrevivam (HARGER, 1982). Um exemplo histórico da ação das enzimas, citado por STRYER (1996), pode ser visto no século XVI, em cervejarias alemãs, onde a cevada era pisada em água por vários dias e em seguida deixada germinar em uma sala úmida e quente. As enzimas  $\beta$ -amilases e maltases, produzidas pelos germes digeriam então o amido a glicose que era posteriormente fermentada.

As enzimas efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos. Embora a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares e são excretadas para fora da célula viva, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER, 2005). Segundo Leadlay (1993), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. Com sua ação, regulam a velocidade de muitas reações químicas presentes neste processo. A denominação *enzima*, proposto em 1867 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymē*, que significa “no fermento”. Atualmente as enzimas identificadas ultrapassam 700 tipos (ROSAS, 2003).

As enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação. Tradicionalmente, as enzimas podem ser denominadas adicionando-se a terminação *ase* ao nome do substrato com o qual realizam reações (LAIDLER, 1954). 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.

Há muito tempo, o homem utiliza enzimas para catalisar uma série de reações. A produção de vinho, pão e queijo antedata os tempos bíblicos, embora não se conhecesse o mecanismo das reações envolvidas (HARGER *et al*, 1982). Segundo Leadlay (1993), as enzimas já eram utilizadas diariamente na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula, muito antes de se entender a sua natureza e função. O uso do malte da cevada para conversão do amido em açúcares fermentescíveis e o uso similar de preparações fúngicas brutas em países orientais são exemplos de alguns usos antigos de enzimas.

Com o gradual desenvolvimento do conhecimento da natureza das enzimas, extratos obtidos a partir de certos tecidos animais, como o pâncreas e a mucosa do estômago ou a partir de tecidos vegetais, como o malte e o mamão ou produzidas por bactérias, leveduras e fungos, foram encontradas muitas aplicações técnicas para as enzimas (LEADLAY, 1993).

As amilases, por exemplo, encontram aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos), indústria química e farmacêutica (BRUCHMANN, 1980; WARD, 1989; QUAGLIA, 1991; LEADLAY, 1993; WAINWRIGHT, 1995; PANDEY *ET al*, 1999; GUPTA *et al*, 2003; SURMELY *et al*, 2003; TUNGA & TUNGA, 2003; SZAKACS, 2004; PANDEY *et al*, 2005; SOCCOL *et al*, 2005).

De acordo com Harger (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases), de origem fúngica ou bacteriana.

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. As enzimas que degradam o amido também 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).

Fellows (1994) relata que a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). Sabe-se que a maioria dos estudos de produção de amilases foi realizada a partir de fungos mesofílicos dentro da faixa de temperatura de 25 a 37 °C. Rendimentos ótimos de  $\alpha$ -amilase foram alcançados entre 30 e 37 °C para *Aspergillus* sp., 30 °C para *A. niger* na produção da amiloglicosidase (COSTA, 1996); 30 °C para a produção de  $\alpha$ -amilase por *A. oryzae* (TUNGA, R.; TUNGA B. S., 2003); 55 °C pelo fungo

termofílico *Thermomonospora*; e a 50 °C por *T. lanuginosus* na produção de  $\alpha$ -amilase (GUPTA et al., 2003). Entretanto, não há relatos de que se tenha testado o aumento da atividade enzimática após crescimento do fungo nas condições ideais e refrigeração de 4 °C por 10 dias.

A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio (SPIER, 2005).

Quando uma cultura microbiana desenvolve-se em um sistema fechado, pode-se confeccionar uma curva de crescimento. Esta pode ser dividida em diferentes etapas: lag, log, estacionária e de declínio. Na fase lag ocorre a adaptação interna da célula ao novo meio de cultura ou alimento. A fase Log é a etapa de crescimento logarítmico da célula. Nesta fase nenhum fator externo ou componente do meio é limitante para o crescimento microbiano. Já a fase estacionária apresenta a estabilidade da massa de células (mas não do número de células) após uma etapa de crescimento. Com a exaustão dos nutrientes e o acúmulo de metabólitos, as células progressivamente reduzem a taxa de crescimento e entram em uma fase onde ocorrem processos de adaptação a condições de crescimento lento ou de latência. A fase de declínio promove a redução do número de células por morte e lise devido à exaustão dos nutrientes do meio e dos compostos de reserva no interior da célula. Muitos microrganismos, porém, são capazes de reduzir seu volume e passar para um processo de latência metabólica. Nesta condição, as células não morrem, mas podem também não ser cultiváveis em meios de cultura ricos (PELCZAR, 1998).

Existem alguns fatores externos que influenciam a atividade enzimática, são eles:

- Temperatura: Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até se atingir a temperatura ótima; a partir dela, a atividade volta a diminuir, por desnaturação da molécula;
- pH: Idem à temperatura; existe um pH ótimo, onde a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é ideal para a catálise.

No estudo enzimático é importantíssimo fazer referência aos chamados inibidores enzimáticos, estes são compostos que podem diminuir a atividade de uma enzima, podendo ocupar temporariamente o centro ativo por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou alterar a conformação espacial da enzima, impedindo sua união ao substrato (inibidor não competitivo).

As amilases fúngicas, que são carboidrases, parecem ser enzima exocelulares, conforme cita Harger (1982). Essas enzimas pertencem à classe das hidrolases que são responsáveis por reações hidrolíticas. A maioria das carboidrases é produzida por diferentes tipos de fungos e muitas espécies produzem diferentes carboidrases. Uma propriedade singular das enzimas é a sua grande especificidade pelo substrato hidrolisando um substrato particular (SPIER, 2005).



#### 2.4.1 Enzimas amilolíticas, sua produção e aplicação

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982).

Gupta *et al* (2003) e Pandey *et al* (2005) citaram que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel.

Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (SPIER, 2005).

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

Outro conceito dado por Gupta *et al* (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. 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.

Spier *et al* (2004) também relataram vários exemplos da utilização das enzimas amilolíticas com o objetivo de modificar matérias primas amiláceas e/ou obter produtos específicos, destacando-se os usos na indústria de alimentos (modificação de farinhas utilizadas em panificação, na modificação enzimática de materiais amiláceos para a obtenção de açúcares, na fabricação de bebidas fermentadas), na etapa de degomagem na indústria têxtil, na indústria de papel, na indústria química e farmacêutica além de seu emprego na indústria de ração animal.

Sabe-se que certos microrganismos produzem dezenas de enzimas de aplicação industrial, sendo muitos deles cultivados e suas enzimas purificadas encontram aplicação comercial. A qualidade e quantidade relativa ou absoluta das enzimas produzidas pelos microrganismos varia muito entre as espécies e mesmo entre as linhagens da mesma espécie, podendo a produção ser melhorada com alterações de meio de cultura, condições de cultivo e mutações genéticas. As enzimas amilolíticas de origem fúngica, que são muitas, são quase todas extracelulares e são marcadamente específicas para cada substrato. A amilose, um dos

componentes do amido e fécula, é formada por unidades de D-glucose unidas linearmente por ligações  $\alpha$ -1,4 (CONN & STUMPF, 1975).

A  $\alpha$ -amilase que ataca as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas das moléculas de amido causa sua solubilização e redução de viscosidade, formando dextrinas e açúcares redutores. A  $\beta$ -amilase rompe as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, sempre a partir das extremidades não-redutoras, com a formação de maltose (SAWADA, 1979).

A glicoamilase, que é referida por alguns autores como maltase fúngica, tem ação sobre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das dextrinas e maltose, convertendo-as em maltose. Atualmente, a denominação amiloglicosidase é preferida. As isoamilases são aquelas que rompem as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 contidas nas dextrinas limite, como por exemplo, a isomaltase e amilo-1,6-glicosidase.

A produção de enzimas amilolíticas teve início no começo do século passado, em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Coube a Takamine o mérito de ter desenvolvido, no início do século passado, o primeiro método para a produção microbiológica de enzima em grande escala – a  $\alpha$ -amilase fúngica Takadiastase (TAKAMINE, 1914) também citado por SOCCOL *et al* (2005). Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados. Também foram isolados ou desenvolvidos microrganismos capazes de produzir enzimas em altas concentrações (COSTA, 1996).

As  $\alpha$ -amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas. As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas são designadas amilolíticas porque promovem a degradação do amido, foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982).

Acredita-se que somente com a ação conjunta da  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, enzima desramificadora e  $\alpha$ -glicosidase, pode-se obter *in vitro*, a completa hidrólise do amido. Entretanto, o processo de degradação do amido vem sendo estudado, sob aspectos mais amplos, ao longo da germinação de sementes de cereais, enquanto as vias de degradação em células de tecidos vegetais vivos e a participação de cada uma destas enzimas na hidrólise do amido, permanecem indefinidas (BECK e ZIEGLER, 1989; SARIKAYA *et al.*, 2000).

#### **2.4.1.1 Alfa-amilases**

A  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glicano glicanoidrolase, EC 3.2.1.1), possui atividade endohidrolítica e atua aleatoriamente sobre ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas, podendo ser encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias.  $\alpha$ -Amilases são membros da família das amilases ou família 13 das glicosídeo hidrolases (GH-13), classificação esta, baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos (HENRISSAT e BAIROCH, 1996) e cuja relação estrutural e evolucionária com outros membros da família das

glicosídeo hidrolases vem sendo amplamente investigada (JANEČEK, 1997; PUJADAS e PALAU, 2001).

As  $\alpha$ -amilases compartilham a estrutura barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, similar a encontrada para a triose fosfato isomerase (TIM, E.C. 5.3.1.1) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19), apresentando no entanto, características distintas em sua estrutura primária que as diferem da TIM e CGTase (JANEČEK *et al.*, 1995; VIEIRA-JUNIOR, 2001).

O tipo de arranjo estrutural encontrado nas  $\alpha$ -amilases pode ser evidenciado também nas famílias GH-70 e GH-77 das glicosídeo hidrolases, desta forma, as famílias GH-13, GH-70 e GH-77 foram organizadas em um novo grupo, GH-H, que reflete aspectos evolutivos mais próximos entre seus membros, como por exemplo, os resíduos catalíticos e a disposição espacial dos mesmos.

Embora diferentes tipos de enzimas sejam capazes de liberar, *in vitro*, glicanos solúveis a partir de grânulos de amido purificados, acredita-se que a única enzima capaz fazê-lo *in planta*, seja a  $\alpha$ -amilase. Ela parece apresentar papel central no processo de hidrólise do amido e por possuir atividade endo-amilolítica. A  $\alpha$ -amilase promove alterações marcantes no grão de amido, fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos nos cereais, capaz ainda de degradá-los inteiramente (PREISS, 1982; BECK e ZIEGLER, 1989; IRVING, 1999).

Em cereais, a expressão da  $\alpha$ -amilase e a sua regulação são temas bastante estudados. A degradação do amido tem papel central entre os eventos bioquímicos na germinação de sementes, fornecendo a energia necessária ao embrião. Esta degradação é iniciada pela indução da  $\alpha$  amilase, responsável pela clivagem das ligações  $\alpha$ -1,4- endoglicolíticas da amilose e amilopectina. No entanto, a completa degradação do amido requer ainda a ação de outras enzimas glicolíticas (HUANG *et al.*, 1990; SUTLIFF *et al.*, 1991; SUBBARAO *et al.*, 1998).

#### 2.4.1.2 Beta-amilases

A  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glicano maltoidrolase) pode ser encontrada em vegetais superiores e em algumas bactérias gram-positivas (PUJADAS *et al.*, 1996). Ela é classificada na família 14 das glicosídeo hidrolases (GH-14) e atua como exo-hidrolase na penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 glicosídica do amido, glicogênio e oligossacarídeos relacionados, removendo a partir da extremidade não redutora da cadeia, sucessivas unidades de  $\beta$ - maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico inicial do açúcar liberado. As  $\beta$ -amilases apresentam no seu arranjo tridimensional a estrutura barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, descrita também nas  $\alpha$ -amilase, todavia, os aminoácidos catalíticos e a disposição espacial destes, difere daqueles encontrados na família 13, revelando a divergência evolutiva entre as duas famílias de enzimas. Existem poucas enzimas amilolíticas comerciais disponíveis no Brasil. Muitas são diástases (encontradas em sementes em germinação e em certas secreções e tecidos animais) usadas em processos de panificação ou em rações animais. As enzimas fornecidas pela SIGMA life science Bio Chemika ( $\alpha$ - amylase e  $\beta$ - amylase), que

promovem a liquefação e sacarificação do amido são, segundo Arce (2005), a dupla de enzimas que apresentaram os melhores resultados de formação de açúcar de amido.

➤ **SIGMA Life Science BioChemika-  $\alpha$ - Amylase®**

É um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de  $\alpha$ -amilase termo-estável, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformes*.

A enzima hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 do amilose e da amilopectina, convertendo rapidamente o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis. Termamyl foi especialmente desenvolvido para promover a liquefação (dextrinização) do amido e produção de maltodextrinas.

➤ **SIGMA Life Science BioChemika-  $\beta$ - Amylase®**

É uma amiloglicosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações  $\alpha$ - 1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido liquefeito. Durante a hidrólise, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A velocidade de hidrólise depende do tipo de ligação e do comprimento da cadeia. A AMG é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose.

## 2.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Produtos de fermentação são usados desde a Antigüidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C. (VILLEN, 2009).

Atribui-se a Bechner, no século XVII, a afirmação de que somente os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Ao contrário do que pensavam alguns pesquisadores que o antecederam, para Bechner o álcool se formava durante o processo de fermentação, julgando erradamente, no entanto, a necessidade de ar para causar o fenômeno que ele considerava semelhante à combustão.

Os primeiros estudos envolvendo o mecanismo da fermentação alcoólica relacionavam à formação dos produtos inicial e final. Foi Black que primeiro postulou, no século XVIII, que o álcool etílico e gás carbônico eram os únicos produtos formados do açúcar durante a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

Entretanto, o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica foi, provavelmente, Lavoisier, em 1789. Coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-a a seres vivos, as leveduras, como agentes causais. Segundo ele, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,9 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7

partes de ácido succínico e uma parte de outras substâncias. As pesquisas subseqüentes no desvendamento das reações intermediárias receberam novo ímpeto com a constatação por Büchner, 1897, que extratos livres de células de levedura possuíam a capacidade de provocar a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980). Assim, a humanidade por longo período se beneficiou desse organismo, mesmo sem saber de sua existência, notada pela primeira vez por Antonie van Leewenhoek (1623-1723), ao observar amostra de cerveja em fermentação, com seu microscópio rudimentar (LIMA et al., 2001).

Depois da formulação da estequiometria da fermentação por Gay-Lussac (1815), Pasteur (1863) demonstrou a natureza microbiológica da fermentação alcoólica como um processo anaeróbio, ou seja, a vida se manifestando na ausência de ar (oxigênio). A partir daí, e principalmente durante as primeiras décadas de 1900, as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico, que ocorre no citoplasma da levedura, responsável pela transformação de açúcar em álcool etílico. Esse processo bioquímico é realizado por mais de uma dezena de enzimas, e pode ser considerado como a oxidação anaeróbica, parcial, da glicose, por ação de leveduras, com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos secundários. É um processo de grande importância, no qual são obtidos todos os álcoois industriais e todas as bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas e, como produto secundário, o gás carbônico. É ainda utilizado na produção de leveduras de panificação e na obtenção de leveduras prensadas.

A produção de etanol pela via fermentativa é acompanhada pela formação de compostos como glicerol, ácido succínico e álcoois superiores. A presença de álcoois superiores no meio fermentativo é indesejável nas destilarias porque dificulta a obtenção do etanol puro. No caso das bebidas alcoólicas, os álcoois superiores desempenham papel importante no aroma (RANKINE, 1967; SUOMALAINEN, 1971). A formação de álcoois superiores nas leveduras ocorre através da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica conforme esquematizado por WEBB & INGRAHAM (1963).

### **2.5.1 Fatores que afetam a fermentação**

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA et al., 2001).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre estes fatores, os mais freqüentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, a acidez do meio (inclusive no tratamento ácido), a presença de sulfito, a

contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces* (BASSO, 1991; BASSO, 2004).

Segundo Menezes (1980), a faixa de temperatura recomendada está entre 25 e 36°C. Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e favorecem o aparecimento de contaminações. À medida em que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol.

As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes à alta temperatura, mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA FILHO et al., 2005). As leveduras são mesófilas e a faixa de temperatura ideal para a fermentação é um aspecto bastante divergente. Um ponto considerado é que a temperatura acima de 35°C favorece a multiplicação de bactérias, reduz a viabilidade do fermento e aumenta a acidez. Amorim (2005) afirmou que a temperatura poderá chegar aos 35°C se conseguir manter a contaminação entre  $5.10^6$  a  $1.10^7$  bactérias/mL. Nesta temperatura, a levedura multiplica menos e aumenta o rendimento.

O pH correto para favorecer a levedura e inibir o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias, está entre 4,0 e 5,0 (MENEZES, 1980). Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5.

No processo com reutilização da levedura, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante o período de uma a duas horas, visando a redução da carga microbiana. Desta forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

### **2.5.2 O agente da fermentação alcoólica**

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais, *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas, economicamente, as leveduras são os agentes mais largamente utilizados (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

O gênero *Saccharomyces* é um dos grupos de microrganismos mais estudados pela comunidade científica. Esse interesse é função da ampla aplicação desses microrganismos de biotecnologia. Essa levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800 (ANDRIETA & STECKELBERG, 2006).

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Porém, a forma da levedura não é indício para identificação de espécies e nem a variedade de formas em um mesmo cultivo pode ser considerado contaminação do mesmo.

As leveduras não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Suas dimensões variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade entre outros fatores. As leveduras caracterizam-se por uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação. A esporulação em leveduras é um fator importante por constituir a base

de um método de reprodução, desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros.

Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares.

Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não fermentativos (WALT; YARROW, 1984).

### **2.5.3 Importância econômica das leveduras**

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente.

Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (*SCP – single cell protein*) e 600.000 toneladas de fermento de pão (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

O consumo de alimentos fermentados vem aumentando desde a década de 1970, e inclui alimentos como produtos lácteos (iogurtes, queijos, soro de leite), salsichas, bebidas fermentadas alcoólicas, vegetais, frutas, molhos, entre outros. Um dos motivos do aumento do consumo é que estes alimentos são considerados naturais e saudáveis (GIRAFFA, 2004).

Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quer na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável, tal microrganismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 2001).

#### **2.5.4 *Saccharomyces cerevisiae***

O gênero *Saccharomyces* tem passado por inúmeras mudanças desde a sua descoberta, há 150 anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi compilada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero.

Entretanto, várias outras divisões ocorreram e outras novas espécies foram descritas, principalmente o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, obtendo-se como resultado, em 1970, 41 espécies dentro do gênero *Saccharomyces*. Walt e Yarrow, citados por Vaughan- Martini; Martini (1993), reduziram drasticamente o gênero *Saccharomyces* em 7 espécies. *Saccharomyces sensu stricto*, previamente com 21 espécies, tornou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e outras espécies previamente agrupadas por Van der Walt, em 1970, foram introduzidas a outros gêneros como *Zygosaccharomyces* e *Tolurasporea*. Esta classificação de Yarrow, mais tarde foi tanto confirmada por alguns autores, quanto contraditória segundo outros (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 1993).

O gênero *Saccharomyces* vem tendo inúmeras mudanças taxonômicas ao longo dos anos. Atualmente, de acordo com a última revisão taxonômica, 14 espécies são aceitas dentro do gênero *Saccharomyces*, as quais estão classificadas em três grupos previamente estabelecidos por van der Walt.

O complexo *Saccharomyces sensu lato* inclui *Saccharomyces barnettii*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces rosinii*, *Saccharomyces servazzii*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces transvaalensis* e *Saccharomyces unisporus*. O segundo grupo *Saccharomyces kluyveri*.

O terceiro grupo, o qual inclui espécies de interesse biotecnológico, consiste do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, compreendendo *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, todos associados com fermentação industrial, e



*Saccharomyces paradoxus*, a única espécie *Saccharomyces sensu stricto* tipicamente isolada a partir de habitat natural (insetos, árvores e exsudatos). Recentemente, três novas espécies isoladas a partir de habitat natural, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzvi* e *Saccharomyces mikatae*, têm sido incluídas dentro do grupo *Saccharomyces sensu stricto* (QUEROL; BELLOCH, 2003 (b)).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como *microrganismo geralmente considerado seguro* (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Além disso, os processos fermentativo e tecnológico bem estabelecidos para a produção em larga escala com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fazem este microrganismo ser bastante atrativo para muitos processos biotecnológicos. Outra importante razão para a aplicabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, que vem sendo bastante facilitado pela publicação, em 1996, do genoma completo da levedura (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

## 2.6 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATÉRIA PRIMA AMILÁCEA

Além da importância alimentícia, outro emprego possível desta planta é a fabricação do álcool, devido ao seu alto valor de carboidratos, pode substituir a cana-de-açúcar. Com isso, muitos produtores rurais podem ser beneficiados com o cultivo da mandioca, podendo, além do cultivo de subsistência, comercializá-la para a indústria do álcool. Espera-se um elevado teor em açúcar a partir da mandioca, devido a existência de grande quantidade de amido, cujo produto final da hidrólise se constitui basicamente em glicose. Obviamente, a produção final de álcool carburante deve corresponder ao investimento efetuado. (GONÇALVES et al., 2009).

Quando considerada a produtividade por tonelada da mandioca em relação à cana-de-açúcar na fabricação do etanol, a mandioca tem um melhor desempenho. Enquanto uma tonelada de cana-de-açúcar, com 140 kg de açúcar total recuperável (ATR), produz 85 litros de álcool, uma tonelada de mandioca, com 25% de amido, pode produzir 170 litros de álcool.

Considerando a produtividade agrícola média em torno de 18 toneladas por hectare, implica um rendimento industrial de 3.060 litros de bioetanol por hectare. Além da vinhaça, efluente do processo de destilação, não se identificaram coprodutos de valor significativo nesse processo (TRINDADE, 1985).

A mandioca foi considerada uma matéria-prima promissora na produção de bioetanol durante a primeira fase do Proálcool, o programa brasileiro de bioetanol, nos anos 1970. Entretanto, tais projetos não tiveram êxito, principalmente devido ao preço elevado do bioetanol obtido de mandioca comparado ao bioetanol de cana-de-açúcar além da irregularidade no fornecimento da matéria-prima. Nos últimos anos, em países asiáticos, principalmente na Tailândia a mandioca tem sido utilizada para produção de bioetanol (JARDINE, et al., 2009).

No Brasil, o aproveitamento da mandioca para obtenção de álcool foi pesquisado no período de 1932-1945. Nesta época, chagaram a funcionar com êxito, por alguns anos, algumas destilarias de álcool de mandioca nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (ALBUQUERQUE, 1969; ARAÚJO, 1975; MENDES, 1992). Uma das principais razões por que a mandioca não tem sido devidamente explorada pela indústria alcooleira parece ter sido o progresso exponencial dessa indústria à base de melaço de cana, que prescinde da trabalhosa e onerosa etapa de hidrólise do amido. Hoje, com a necessidade premente de encontrar novas fontes de energia e com o grande avanço tecnológico, tornou-se oportuno um reexame desta via de industrialização da mandioca.

A manufatura de álcool a partir de mandioca consistia em transformar o tubérculo em farinha, pelo processo tradicional, suspender a farinha em água e aquecer para obter uma mistura pastosa, hidrolisar o amido gelatinizado à glicose, pelo método ácido, fermentar e destilar, similarmente ao processamento com qualquer outro material amiláceo (STARK, 1954). O malte do milho passou a ser empregado em substituição aos ácidos minerais (hidrólise ácida), tendo sido constatadas muitas vantagens, tais como não-corrosão do equipamento e maior rendimento de fermentação. TEXEIRA (1960) comparou alguns agentes de conversão de amido em açúcares fermentescíveis, tendo conseguido os maiores rendimentos em álcool quando utilizou a biomassa seca, obtida pela fermentação em cultura submersa de *Aspergillus niger* NRRL 337, como se pode observar na Tabela 4:

**Tabela 4.** Agentes de Conservação de Amido

<b>Agentes de Conversão</b>	<b>Rendimento em Álcool (% do valor teórico)</b>
Ácidos Inorgânicos	43 – 74
Malte de Milhos 11%	70 – 74
Malte de Cevada 7%	70 – 74
Biomassa Seca 10%	80 – 85

Conforme a pesquisa realizada por YANG et al., 1977, o processo de obtenção de etanol a partir de mandioca por fermentação em cultura descontínua pode ser uma opção economicamente viável que depende apenas de análise econômica. Foi colocado também que um complexo alcoolquímico, comparado com complexo petroquímico, necessita de um menor número de unidades satélites e oferece a possibilidade de poder ser dimensionado para suprir as necessidades de mercado de um seletivo número de produtos, aspectos esses que parecem importantes ao considerar a carência de capital e o crescimento de diferentes taxas da demanda dos produtos básicos da indústria petroquímica.

Foi desenvolvido por BIANCO et al., 1976, um processo de conversão da mandioca em álcool. Para a produção de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* e de amiloglicosidase de *Aspergillus awamori*, em frascos de Erlenmeyer sob agitação e fermentador pequeno, respectivamente, utilizaram-se meios contendo farinha de mandioca como principal constituinte. A produção de xarope de dextrose a partir da farinha foi conseguida mediante a aplicação das soluções enzimáticas obtidas nas fermentações acima referidas.

Como agente de fermentação alcoólica, utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1133, realizando-se alguns ensaios em processo descontínuo e em contínuo.

Foi concluído pelos autores que o processamento global (conversão do amido de mandioca em glicose, multiplicação do fermento e produção de álcool PR fermentação contínua) apresentou resultados satisfatórios, preenchendo expectativas alimentadas quanto à utilização da mandioca para a produção de álcool de boa qualidade, em condições possivelmente competitivas com fabrico de álcool de cana-de-açúcar.

Para a Nordon, Indústrias Metalúrgicas S.A (1976), a mandioca era a única matéria prima que permitia que fossem atingidas as metas do Pró-álcool. O processo contínuo de destilarias autônomas apresentado pela empresa era muito interessante teoricamente. Sua instalação é bivalente, isto é, pode ser utilizada com cana-de-açúcar, bastando eliminar os estágios iniciais correspondentes até a sacarificação da mandioca, que são responsáveis pelo aumento de custos da instalação de 30% a 40%. O processo envolve a industrialização de fécula de mandioca pelo método convencional associada a uma fermentação alcoólica tipo Melle-Boinot, uma unidade de destilação de multiestágios e um processo de tratamento de resíduos, combinados num sistema contínuo e automatizado. Em seqüência à obtenção da fécula, o cozimento é realizado em dois estágios, alta e baixa pressão a 140°C, e a hidrólise, que é considerada o “calcanhar- de- Aquiles” da tecnologia do álcool de mandioca, é efetuada por processos enzimáticos. Quanto à etapa final, o processo prevê duas alternativas: concentrar a vinhaça para obter um produto com alto teor de proteínas, ou incorporar mais um sistema fermentativo para gerar metano combustível que poderia suprir, em parte, as necessidades da própria instalação (SAWADA, 1979).

O emprego de amido, como complemento e/ou alternativa à sacarose da cana-de-açúcar, pode levar o desenvolvimento agroindustrial à várias regiões brasileiras que têm tradição no cultivo de amiláceos, principalmente a mandioca (*Manihot spp*). Essa matéria prima, contudo, não é diretamente fermentável, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias.

A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática. A primeira apresenta algumas desvantagens tais como: elevado consumo de energia, baixo rendimento e seletividade e pouca flexibilidade operacional. Em função disso, os processos enzimáticos assumiram maior importância, pois conseguiram eliminar quase que totalmente essas desvantagens.

Por outro lado, a produção de etanol por via fermentativa é uma tecnologia muito desenvolvida no Brasil, cuja transferência renderia muitas divisas ao país e colocá-lo-ia em condições muito favoráveis no panorama energético, principalmente se forem consideradas as constantes oscilações do preço do petróleo internacional (ZANIN et al., 2000).

A utilização do etanol como combustível mostrou-se benéfica, tanto do ponto de vista ambiental quanto pela eficiência na geração de trabalho mecânico, além de sua característica renovável e, portanto, praticamente inesgotável (TROVATI *et al.*, 2002).

Os resíduos de mandioca (amido-processamento de resíduos) de plantas de amido de mandioca é uma boa matéria-prima para produção etanol. Os experimentos são executados em duas etapas: hidrólise enzimática a qual converte materiais celulósicos e amido a açúcar fermentável e fermentação alcoólica que converte o açúcar fermentável a etanol por *S. cerevisiae*.

O custo de produção de um litro de etanol que usa resíduos de mandioca como uma matéria-prima foi 1,5 vezes maior que o dobro do custo de um litro obtido da raiz de mandioca (TEERAPATR *et al.*, 2004). Porém, considerando o impacto negativo do resíduo de mandioca e o fato de que a operação de um aterro sanitário pudesse ser diminuída em até 81%, o processo é ambientalmente sólido e de imenso benefício econômico. Assim, a utilização de resíduo de mandioca para produção de etanol pode prover o uso mais efetivo de recursos naturais e pode levar ao desenvolvimento de tecnologias para a redução do custo adicional (FONSECA, 1996; LEONEL & CEREDA, 1999; FERREIRA *et al.* 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi a comparação entre os processos de hidrólise ácida e de hidrólise enzimática de farinha de mandioca visando a adequada e maior produção de etanol.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterização físico-química das farinhas de 3 variedades de mandioca cultivadas no município de Junqueiro, no estado de Alagoas;
- Verificação da viabilidade de crescimento das espécies de leveduras que serão utilizadas na fermentação etanólica;
- Realização de ensaios de hidrólise ácida com farinhas de três variedades de mandioca visando à obtenção de glicose para fermentação;
- Realização de ensaios de hidrólise enzimática com farinhas de três variedades de mandioca visando à obtenção de glicose para fermentação;
- Realização de ensaios de fermentação alcoólica com três diferentes tipos de leveduras;
- Comparação de todos os ensaios de fermentação tomando-se como parâmetro o teor alcoólico do vinho final.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo destina-se à apresentação da metodologia analítica empregada ao presente trabalho, bem como especifica o microrganismo e a matéria prima utilizados, descrevendo a seqüência dos ensaios conduzidos e relaciona os reagentes e equipamentos necessários a desenvolvimento experimental.

Os ensaios práticos foram realizados no Laboratório Tecnológico de Bebidas e Alimentos-LTBA, da Universidade Federal de Alagoas- UFAL.

### 4.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas duas cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de linhagem UPSA C3 (12), UPSA C1 (10) cedidas pelo Centro de Ciências Biológicas (CCBI), além da levedura comercial, fermento biológico Fermix, conforme Figuras 17 e 18.



**Figura 17.** Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 18.** Levedura Comercial.

#### **4.1.1 Meios de Manutenção**

As linhagens selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em meio YMA (extrato de levedura, malte e ágar) (NAKAJIMA et al., 1990) com a seguinte composição em g/L: glicose 10,0; extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; ágar 15,0.

Preparou-se um meio YPDA (extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar) para desenvolvimento e estoque da levedura, utilizando-se 3g de extrato de levedura, 6g de peptona, 6 de dextrose, 6g de ágar e água destilada em quantidade suficiente para se obter um volume de 300mL. Verteu-se 5mL deste meio em tubos de ensaio, tampando-os posteriormente com algodão. Em seguida, os mesmo tubos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, as cepas foram inoculadas e mantidas por 24h em estufa a 30°C. Estes tubos foram cobertos com papel filme e estocados sob refrigeração.

#### **4.1.2 Determinação de Massa Celular**

A massa celular de *Saccharomyces cerevisiae* foi determinada pesando a massa celular seca, após a separação por centrifugação e duas lavagens com água destilada. Para determinar a massa celular produzida na fermentação foi utilizado o método direto, que consiste na secagem de um determinado volume do mosto fermentado.

Primeiramente pesaram-se placas de Petri previamente secas (P1), e com auxílio de uma pipeta volumétrica, transferiu-se 10 ml de amostra de mosto fermentado para um tubo de centrifuga. Centrifugou-se a mesma a 4500 rpm por cinco minutos. Lavou-se o precipitado duas vezes transferindo-o então, para a placa. As placas foram para uma estufa a 80°C até atingirem peso constante. Depois de resfriada pesou-se novamente as placas (P2). O valor da massa de levedura seca foi calculado pela diferença (P1-P2) sobre o volume de amostra centrifugada, obtendo-se assim o valor final expresso em gramas por litro de vinho fermentado.

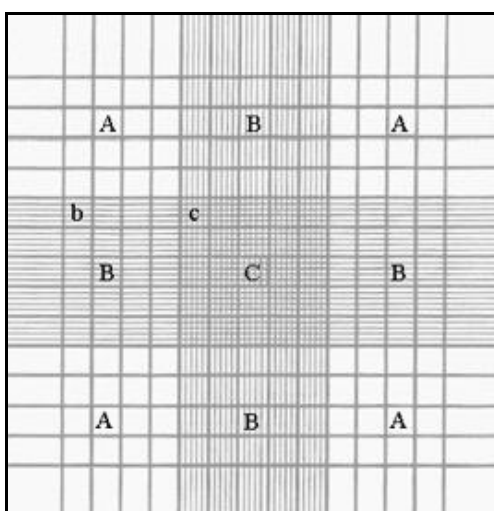
#### **4.1.3 Contagem de Células**

As leveduras empregadas no presente estudo foram, inicialmente, testadas numa fermentação prévia em meio sintético YDP (extrato de levedura, dextrose, peptona) tendo por objetivo a avaliação do crescimento microbiológico. Para essa etapa, as leveduras foram transferidas dos tubos de manutenção, com o auxílio de uma alça de platina (uma alçada) para outros tubos contendo meio líquido por 24h a 30°C. Após esse período, as leveduras fermentaram satisfatoriamente, sendo que, durante esse tempo, o desenvolvimento das células foi acompanhado e as mesmas passaram por uma contagem em câmara de Neubauer. O crescimento microbiológico e a contagem das células através foram acompanhados utilizando microscópio em resolução 0,40 e espectrofotômetro para medição de absorbância.

A câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes, de medidas conhecidas. Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, que juntos formam um quadrado maior.



**Figura 19.** Lâmina de Microscopia



**Figura 20.** Subdivisões dos Quadrantes

Pode-se notar que estes quadrantes têm sub-divisões diferentes, fazendo com que o critério para escolha do quadrante onde serão contados os esporos, seja o tamanho dos esporos a serem quantificados. Assim, usualmente, esporos muito pequenos são contados no quadrante C, os de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto esporos grandes são contados no quadrante A.

A área total compreendida pelos 9 quadrantes é de  $9 \text{ mm}^2$  sendo que cada quadrante (A, B e C) são quadrados de  $1 \times 1 \text{ mm}$ . Ao ser colocada a lamínula (especial para ser usada na câmara de Neubauer) a distância da lamínula até a lâmina (profundidade) mede  $0,1 \text{ mm}$ , o que permite se obter um volume de  $0,1 \text{ mm}^3$  em cada quadrante.

A suspensão de esporos deve ser preparada utilizando-se 1 gota de Tween 80 (espalhante) para cada 100 ml, o que evita a agregação dos esporos em grupos, que dificulta e compromete a confiabilidade da contagem.



Com uma pipeta Pasteur, coleta-se uma pequena alíquota da suspensão preparada, sob agitação constante, e deposita-se em um dos canais laterais ao campo central, a amostra, até que todos os canais interligados estejam completos. Aguarda-se 1 minuto para que haja a sedimentação dos esporos e procede-se a contagem ao microscópio.

No quadrante A, conta-se o número de esporos observados. Como o quadrante A tem  $0,1 \text{ mm}^3$  de volume, ao serem contados os esporos nos 4 quadrantes, tem-se o número de esporos em um volume de suspensão igual a  $0,1 \text{ mm}^3 \times 4 = 0,4 \text{ mm}^3 (= 0,0004 \text{ cm}^3)$ . Logo o  $n^\circ$  médio de esporos ( $n^\circ$  observado  $\div 4$ ) está contido em um volume igual a  $0,0004 \text{ cm}^3 \div 4 = 0,0001 \text{ cm}^3$ . Para se obter o número estimado de esporos/ml faz-se o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ médio de esporos dos campos A}}{\text{x esporos}} \frac{\text{----- } 0,0001 \text{ cm}^3}{\text{----- } 1 \text{ cm}^3 (= 1 \text{ ml})}$$

Logo, o número de esporos/ml é igual a:

$$(\text{n}^\circ \text{ médio de esporos contados nos campos A}) \times 10^4$$

No quadrante B conta-se o número de esporos observados em 3 sub-quadrantes (b) de B, dois do canto e um central.

Como o quadrante B (com  $0,1 \text{ mm}^3$  de volume) é dividido em 20 sub-quadrantes, ao serem contados os esporos nos 3 sub-quadrantes (b), tem-se o número de esporos em um volume de suspensão igual a  $0,005 \text{ mm}^3 \times 3 = 0,015 \text{ mm}^3 (= 0,000015 \text{ cm}^3)$ .

Logo em 1 sub-quadrante (b) temos o  $n^\circ$  médio de esporos ( $n^\circ$  observado  $\div 3$ ) em um volume de  $0,000015 \text{ cm}^3 \div 3 = 0,000005 \text{ cm}^3$ . Para se obter o número estimado de esporos em B, com um volume 20 vezes maior que b, devemos considerar que temos 20 vezes mais esporos contidos em um volume de  $0,000005 \text{ cm}^3 \times 20 = 0,0001 \text{ cm}^3$ . Para se obter o número estimado de esporos/ml faz-se o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ médio de esporos em b x 20}}{\text{x esporos}} \frac{\text{----- } 0,0001 \text{ cm}^3}{\text{----- } 1 \text{ cm}^3 (= 1 \text{ ml})}$$

Logo, o número de esporos/ml é igual a:

$$(\text{n}^\circ \text{ médio de esporos contados em b}) \times (2,0 \times 10^5)$$

Fazendo-se as contagens nos 4 quadrantes de B, tem-se 4 repetições, de onde se pode tirar uma média.

No quadrante C conta-se o número de esporos em 5 sub-quadrantes (c) de C, os 4 dos cantos e o sub-quadrante central.

Como o quadrante C (com  $0,1 \text{ mm}^3$  de volume) é dividido em 25 sub-quadrantes, ao serem contados os esporos nos 5 sub-quadrantes (c), tem-se o número de esporos em um volume de suspensão igual a  $0,004 \text{ mm}^3 \times 5 = 0,02 \text{ mm}^3 (= 0,00002 \text{ cm}^3)$ . Logo em 1 sub-quadrante (c) temos o nº médio de esporos ( $\text{n}^\circ$  observado  $\div 5$ ) em um volume de  $0,00002 \text{ cm}^3 \div 5 = 0,000004 \text{ cm}^3$ . Para se obter o número estimado de esporos em C, que tem um volume 25 vezes maior que c, devemos considerar que temos 25 vezes mais esporos contidos em um volume de  $0,000004 \text{ cm}^3 \times 25 = 0,0001 \text{ cm}^3$ . Para se obter o número estimado de esporos/ml faz-se o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ médio de esporos em c} \times 25}{\text{x esporos}} \text{ ----- } \frac{0,0001 \text{ cm}^3}{1 \text{ cm}^3 (= 1 \text{ ml})}$$

Logo, o número de esporos/ml é igual a:

$$(\text{n}^\circ \text{ médio de esporos contados em c}) \times (2,5 \times 10^5)$$

#### 4.1.4 Meio YPD (Yeast/ Peptone/ Dextrose) líquido para fermentação

Para o preparo do inóculo nos ensaios de fermentação, utilizou-se meio de cultura com a seguinte composição:

- » 6g de extrato de levedura;
- » 12g de peptona;
- » 12g de dextrose.

Este meio tinha seu pH ajustado em 5,0.

## 4.2 MATÉRIA PRIMA

Para os ensaios, utilizou-se farinhas de 3 variedades de mandioca, cedidas pela casa de farinha Povoador do Riachão, do município de Junqueiro, localizado no estado de Alagoas. As três variedades cultivadas nessa região e utilizadas no presente trabalho são: Santa Catarina (SC), Sergipana (SE) e Isabelinha (IS). As farinhas passaram por uma caracterização envolvendo análises físico-químicas, tais como determinação de amido, cinzas, proteína bruta, lipídios, glicose, pH, acidez total e açúcares redutores totais.

## 4.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 4.3.1 Determinação de amido

A dosagem de amido é muito importante para as empresas de fécula. Permite estabelecer o rendimento de extração e a qualidade do produto a ser comercializado. A análise pode ser feita por diversos métodos, dependendo das disponibilidades. Muitas empresas e o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985) usam o método polarimétrico, com um valor de ângulo de rotação específico para mandioca, batata, trigo, etc. Os mais usados (enzimático ou ácido) dosam o amido a partir de seus açúcares redutores. Todos apresentam limitações, vantagens e desvantagens. Para uso rotineiro em uma indústria vários quesitos são importantes.

A análise por enzimas é cara e complicada. Neste trabalho é divulgado um método simples e barato, que substitui a autoclave por um microondas e dispensa o uso de espectrofotômetro, ambos equipamentos caros e não disponíveis nas fecularias. O método químico (Layne- Eynon) é empregado também nas usinas de cana-de-açúcar.

#### 4.3.1.1 Metodologia de análise de amido por hidrólise ácida:

Pesar exatamente cerca de 1,0 g de amostra, previamente seca (ou com umidade conhecida) em Erlenmeyer de 250 mL e anotar esse peso. Dever ser feita uma amostra por frasco. Adicionar cerca de 50 mL de HCl 1M (8,5 mL de HCl em 1 litro destilada). Fechar os Erlenmeyers com um tampão de algodão envolvido por filme plástico auto-aderente. Os frascos contendo as amostras são colocados, em recipiente plástico para microondas com um pouco de água no fundo para não secar. Os Erlenmeyer permanecem em microondas durante 20 minutos na potência máxima. Após este período o amido se transformou em açúcares e algumas gotas são retiradas para o teste com Lugol (Iodo em iodeto de potássio) que deve ficar amarelo. A seguir a amostra deve ser neutralizada com NaOH 10% (100g NaOH/L de água) usando três gotas de fenilftaleína como indicador até que a coloração da solução fique rósea. Após neutralização o volume é completado em balão volumétrico para 250 mL e faz-se a titulação de açúcares por Layne-Eynon.

#### 4.3.1.2 Cálculo do fator das soluções

Calcular a quantidade de glicose correspondente a 10m de cada uma das soluções A e B.

$$f = L \frac{P}{100} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

**L** = mL da solução de glicose gastos

**P** = peso da glicose usada (g%)

Nota: O valor de **f** deverá ser próximo a 0,05 g.

#### 4.3.1.3 Cálculo do teor de amido nas amostras:

Para calcular o amido na fécula usa-se o seguinte cálculo.

% Amido:  $250 \cdot TL \cdot 0,9 \cdot 100 / \text{Leitura média} \cdot PA$

Onde:

250 é o volume total da diluição da amostra de fécula

TL foi calculado em C e serve para as soluções A e B até que acabem

0,9 é o fator que transforma açúcares redutores em amido

100 é para expressar o amido em porcentagem da amostra

Leitura média é a leitura da titulação da amostra de fécula

PA é o peso da amostra de fécula usada, seca ou úmida.

A fórmula pode ainda ser simplificada como segue:

**% Amido:  $250 \cdot TL \cdot 90 / \text{Leitura média} \cdot PA$**

#### 4.3.2 Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas) (018/IV-IAL)

As cinzas de um alimento correspondem ao resíduo obtido por incineração em temperaturas de 550 a 570°C. As cinzas não podem conter pontos de carvão e são geralmente brancas ou acinzentadas.

Procedimento: colocar em mufla a 550°C por no mínimo 1 hora o cadinho de porcelana previamente identificado. Transferir para o dessecador por no mínimo 30 min (ou até temperatura ambiente) e pesar em balança analítica. Pesar 2 a 10 g de amostra neste recipiente previamente tarado. Se a amostra for líquida, seque-a em chapa elétrica e carbonize em temperatura baixa. Incinere em mufla a 550°C por 3 a 4 horas ou até que fiquem brancas ou ligeiramente acinzentadas. Esfriar em dessecador por no mínimo 30 min e pesar.

$$\text{Cinzas} = \frac{100 \times N}{P} \quad (\text{Eq.2})$$

Onde:

**N** = massa de cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho)

**P** = massa tomada da amostra

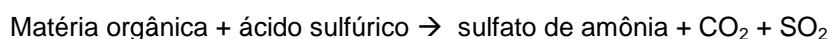
#### 4.3.3 Determinação de proteínas (método de Kjeldahl)

O nitrogênio presente nos alimentos pode ser protéico, como também proceder de sais de amônia, de bases nitrogenadas, etc. No dosamento de proteínas pelo método de Kjeldahl, determina-se o nitrogênio total da amostra, que através de cálculo é transformado em nitrogênio protéico (proteína na amostra). Para tanto, considera-se que cada 100 g de proteína contêm, em média, 16 g de nitrogênio, obtendo-se desse modo o fator 6,25 (100/16), que multiplicado pelo percentual de nitrogênio total da amostra dará o percentual da fração protéica na mesma.

O método se baseia na combustão úmida através de aquecimento com ácido sulfúrico concentrado na presença de catalisadores, resultando na redução do nitrogênio orgânico da amostra a amônia, que é capturado em solução alcalina formando sulfato de amônia. A amônia é, então, destilada em ignição com uma solução padrão de ácido diluído (ácido bórico) e finalmente titulada com solução padrão de um álcali (ácido clorídrico), dando o conteúdo de nitrogênio orgânico da amostra.

##### 4.3.3.1. Etapas do processo:

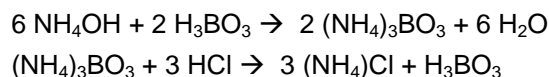
- Digestão da matéria orgânica



- Destilação do nitrogênio



- Titulação do nitrogênio



#### 4.3.3.2. Procedimento:

➤ Digestão da matéria orgânica

Transferir 0,5g da amostra para um tubo de Kjeldahl e adicionar 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8 misturados e triturados em almofariz e pistilo). Na capela de exaustão de gases, adicionar ao tubo cerca de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deve-se tentar fazer com que a amostra e os reagentes caiam no fundo do tubo sem tocar as paredes, para que não haja perdas. Acoplar o tubo ao digestor de Kjeldahl, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo para evitar a digestão violenta e conseqüente perda do material.

A cada 15 min elevar a temperatura suavemente (50°C) até que a mesma chegue a 350°C. O tempo de digestão varia de 1 a 4 horas. A amostra está digerida quando apresentar coloração incolor ou levemente esverdeada. Desligar o aquecedor e deixar 15 a 30 min para esfriar, colocando na boca do tubo um tampão de algodão.

➤ Destilação do nitrogênio

Transferir para um erlenmeyer de 250 mL 25 mL de ácido bórico a 4% e adicionar 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25 e 2 gotas de indicador verde de bromocresol 0,2%. Preparar o destilador de kjeldahl, mergulhando a saída do condensador no erlenmeyer, tendo o cuidado de observar se a extremidade final deste está completamente mergulhada na solução de ácido bórico. Adicionar ao tubo contendo a amostra digerida água destilada até um pouco menos da metade do tubo e 3 a 5 gotas de fenolftaléina 1%. Acoplar o tubo ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, desligar o aquecimento e adicionar, lentamente, NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa). Fazer a destilação até recolher um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

➤ Titulação do nitrogênio

Titular a solução do erlenmeyer com ácido clorídrico 0,1 N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada.

Cálculo:

$$\text{Proteína Total (g/100g)} = \frac{V_{HCl} \times f_{HCl} \times N_{HCl} \times F \times 1,4}{P} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

**V** = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N

$f$  = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N

$F$  = fator de correspondência nitrogênio – proteína. O valor de F para alimentos em geral é 6,25

$P$  = massa tomada de amostra

#### 4.3.4 Determinação de Lipídios Através do Procedimento TOG (teor de óleos e graxas)-Horiba

➤ Calibração- Branco

- a) Colocou-se o solvente (exano) na cubeta;
- b) Selecionou-se SET n02 + ENT + AJUST + ENT;
- c) Acionou-se ESC e ZERO CAL.

➤ Padronização

- a) Preparou-se uma solução padrão, colocando-se inicialmente certa quantidade de solvente num balão volumétrico de 50 mL;
- b) Pesou-se certa massa do óleo pesado com a seringa fornecida com o equipamento (1 gota), inserindo-a no balão com solvente. Deve-se agitar tão logo acrescentar o óleo ao balão para que o mesmo não adira à superfície deste. Então, completa-se o volume do balão com o solvente;
- c) Fez-se a conversão da concentração de óleo na solução padrão para a unidade do equipamento (mg/L, por exemplo), da seguinte forma:

**Se a massa de óleo pesada foi 0,0033 g, em 50 mL = 66mg/L**

- d) Colocou-se a solução padrão na cubeta e insere-a no equipamento;
- e) Acionou-se no equipamento SET n01 + ENT. Selecione o valor através das setas para cima e para baixo (para o exemplo acima, 66) e, em seguida, ENT + ESC + SPAN.

➤ Preparo da Amostra

- a) Colocou-se 60 mL da amostra em 50 mL de solvente em um balão de decantação e agita-se para que ocorra a extração do óleo presente na amostra;
- b) A mistura solvente + óleo deve ser filtrada na presença de sulfato de sódio anidro para evitar a passagem de água na alíquota que será analisada.
- c) O material filtrado corresponde à mistura solvente + óleo, cuja concentração foi obtida no equipamento.

Obs.:

- 1) Nenhuma quantidade de água deve passar para a cubeta. Caso ocorra passagem de água mesmo com a filtração em sulfato de sódio anidro, deve-se fazer nova filtração;
- 2) Para uma nova leitura, ao colocar a cubeta no equipamento, apertar ESC para leitura do novo valor;
- 3) OF: LEITURA ACIMA DA ESCALA (200 PPM)
- 4) UF: LEITURA ABAIXO DA ESCALA
- 5) Molhar o sulfato de sódio anidro com pequena quantidade de solvente antes da filtração
- 6) Após cada leitura, deve-se lavar a cubeta com o próprio solvente;
- 7) Caso a quantidade de óleo da amostra seja grande, lavar a cubeta com água e detergente, porém secar bem, pois não deve conter água na mesma.

#### 4.3.5 Determinação de Glicose

A determinação de glicose foi feita por dois métodos: o método de Enyon Lane e o método enzimáticos de Glicose Oxidase que estão descritos a seguir:

##### • Método ENYON LANE

Este método fundamenta-se na redução do  $\text{Cu}^{2+}$  (oxidante na solução de Fehling A) a  $\text{Cu}^{1+}$  (em meio alcalino), com formação de óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), o qual forma um complexo corado com o agente cromogênico.

Quantifica-se o volume necessário da solução a ser analisada (contida na bureta) para que haja a precipitação completa de todo o cobre da solução de Fehling A. As substâncias redutoras presentes na amostra reduzem o cobre contido no licor de Fehling (proveniente da solução de Fehling A), que é uma solução alcalina contendo o complexo cupritartarado. A cor azul escura da solução desaparece com a redução do cobre, formando o óxido cuproso de cor vermelho tijolo, usando como indicador o azul de metileno.

→ Preparo da solução de Fehling A:

Pesar 69,28g de sulfato de cobre penta-hidratado cristalizado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Dissolvê-los em água destilada, completando-se o volume até 1L a  $20^\circ\text{C}$ . Conservar em frasco de cor âmbar.

→ Preparo da solução de Fehling B:

- Pesar em um bécker de 1L 346g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e adicionar aproximadamente 350mL de água destilada;
- Pesar em um bécker de 500mL 100g de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e adicionar 250mL de água destilada;



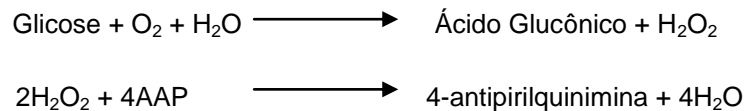
- Transferir as duas soluções para balão volumétrico de 1L, completar o volume e homogeneizar.

→ Procedimento:

- Colocar os erlenmeyers contendo 50mL das soluções “A” e “B” sobre a chama do bico de Bunsen;
- Encher uma bureta de 25mL com a solução de amostra a ser analisada. Aferir no ponto zero;
- Quando a solução do erlenmeyer entrar em ebulição marcar 2 minutos, colocar 2 a 3 gotas de azul de metileno a 1%;
- Começar o gotejamento da amostra da bureta sobre o erlenmeyer até a coloração vermelho tijolo;
- Fazer a leitura do volume gasto na bureta.

- Método de GLICOSE-OXIDASE

Glicose-Oxidase (GLICOX) é um método colorimétrico, onde se usa uma enzima específica para glicose. Ao adicionar-se glicose em uma solução tampão de fosfatos em pH 7,4, contendo glicose-oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina (4-AAP) e p-hidroxibenzoato, processam-se as seguintes reações:



A Figura 21 mostra o Kit GLUCOX utilizado nas determinações de glicose.



**Figura 21.** Kit GLUCOX

O produto formado pela oxidação de 4-aminoantipirina (4-antipirilquinimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade, diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação (Figura 22), é medida em espectrofotômetro com absorvância de 510nm e concentração de glicose é obtida através de uma curva padrão, que se obtém fazendo-se uma curva de calibração do equipamento, através de padrões (soluções de concentrações rigorosamente conhecidas). A concentração de frutose é calculada pela diferença da concentração de açúcares redutores totais (ART) e da concentração de glicose obtida pelo método em questão.

→ Procedimento:

1. Preparo do reagente de cor para uso: transferir todo o conteúdo de um frasco de tampão/enzima para um balão volumétrico de 250ml e completar o volume com água destilada/deionizada;
2. Foi misturado 4ml da solução de glicose-oxidase + 40 $\mu$ l da amostra de glicose (concentração de glicose variando de meio em meio a partir de 1 até 5g/l) em um tubo de ensaio de 14ml;
3. Agitar os tubos no agitador de tubos;
4. Colocar as amostras em banho maria a 37°C por 10 minutos;
5. Medir no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 510nm o valor da absorvância.



**Figura 22.** Oxidação de 4-aminoantipirina

#### **4.3.6 Determinação do Teor Alcoólico (Método Ebulliométrico)**

Consiste na determinação da porcentagem de álcool em uma mistura, solução alcoólica, bem como do álcool anidro e hidratado.

Antes de se efetuar qualquer determinação por ebulliometria, necessário se faz a fixação do ponto zero na escala do ebuliômetro, que no caso em consideração, vem separada do mesmo.

Este ponto indica o ponto de ebulição da água à pressão atmosférica no momento das análises. Poderá servir por várias horas de determinação do teor alcoólico por este procedimento, exceção feita quando se notar bruscas mudanças nas condições atmosféricas. Neste caso, efetua-se um novo zero na escala.

##### **4.3.6.1. Equipamentos e Materiais**

- Ebuliômetro Modelo “Dujardin-Salleron”;
- Pisseta;
- Becker de 100mL;
- Tubo de Ensaio Específico.

##### **4.3.6.2. Procedimento para Aferição do Ebuliômetro**

Retiramos o termômetro que fica inserido na caldeira do ebuliômetro e lavamos a caldeira com água destilada. Em seguida, colocamos a água destilada no tubo de ensaio específico para este fim até o nível indicado(15mL) e transferimos para a caldeira. Conectamos o termômetro na posição para leitura, acendemos a lamparina e a colocamos sob a caldeira.

Após alguns minutos, a coluna de mercúrio começa a se elevar através da coluna(tubo capilar) de mercúrio do termômetro até que se estabilize. Depois da estabilização, observamos o filamento de mercúrio no termômetro. Anotamos a leitura. Fixamos esse valor na régua(disco) que acompanha o ebuliômetro.

##### **4.3.6.3. Procedimento para Determinação do Etanol**

Esvaziamos a caldeira e esperamos a mesma resfriar. Removemos o termômetro e lavamos a caldeira algumas vezes com a amostra (solução a ser analisada) no tubo de ensaio específico até o nível indicado (50mL) e em seguida, transferimos para a caldeira do ebuliômetro. Conectamos o termômetro na caldeira e enchemos o condensador com água. Acendemos a lamparina e colocamos sob o condensador. Quando a amostra começa a se aquecer, o filamento de mercúrio eleva-se no interior do termômetro.

De acordo com a figura 23, observou-se, no termômetro, a elevação do filamento de mercúrio até a sua estabilização e anotamos então a leitura em °C. Na régua(ou disco) que foi aferido como descrito anteriormente, localizamos o teor alcoólico correspondente.



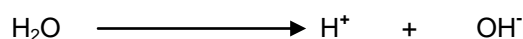
**Figura 23.** Ebulliômetro.

#### **4.3.7 Determinação do pH pelo Método Potenciométrico (017/IV- IAL)**

Consiste na determinação do potencial hidrogeniônico (pH) de um meio. Medindo apenas a quantidade dos íons  $H^+$  já dissociados (acidez ativa, real ou atual). O pH não mede os  $H^+$  dissociáveis ou ainda não dissociados (acidez potencial). A concentração hidrogeniônica, que determina o pH dos alimentos, é um dos principais fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição dos microrganismos, que nele se encontram presente. Cada microrganismo tem um pH mínimo, ótimo e máximo de crescimento. Em geral os bolores e as leveduras são mais tolerantes a pH mais baixos (índices de acidez mais elevados) do que as bactérias.

A maioria dos alimentos têm pH ácido ou próximo da neutralidade. Os alimentos que têm pH baixo são mais estáveis, do ponto de vista microbiológico, do que os alimentos com pH neutro. A extraordinária facilidade com que se conserva alimentos fermentados está relacionada com os seus valores baixos de pH.

Os fenômenos da acidez e da alcalinidade dependem da ionização das substâncias. Por exemplo, a água pura pode ionizar-se em íons hidrogênio e hidroxila da seguinte maneira:



Contudo, somente poucos íons hidrogênio e hidroxila apresentam-se isolados na água pura, porque eles têm uma forte tendência a recombinar-se um com o outro. Um litro de água

contém 55,55 moles de água, mas somente  $10^{-7}$  mol estão na forma ionizada. Somente uma molécula de água de cada 555.500.000 é separada em íons.

Desde que cada molécula que ioniza dá origem a um íon  $H^+$  e um  $OH^-$ , há  $10^{-7}$  mol de  $H^+$  e  $10^{-7}$  mol de  $OH^-$  por litro de água. Como a acidez e a alcalinidade de uma solução depende da concentração molar de íons hidrogênio, quanto maior a concentração de  $H^+$ , mais ácida é a solução.

A concentração molar de íons hidrogênio é mais convenientemente expressa em termos de pH (potencial de hidrogênio), que é definido como:

$$pH = \log 1/[H^+] \text{ ou } pH = -\log [H^+]$$

Para a água pura, que tem  $[H^+]$  de  $10^{-7}M$ , tem-se:

$$pH = -\log 10^{-7} \text{ ou } pH = -(-7).\log 10 = 7. 1 = 7$$

Este pH representa a neutralidade, o que significa que ela não é nem ácida nem é alcalina.

O vinagre tem uma  $[H^+]$  de  $10^{-3}$  (0,001M), assim ele é ácido e seu pH é 3.

Por outro lado se a  $[H^+]$  é menor do que  $10^{-7}$ , a solução é alcalina. O leite de magnésio tem uma  $[H^+]$  de  $10^{-10}$ , tornando-se alcalino com pH igual a 10.

Para finalidades práticas, a escala de pH varia de 0 à 14. É importante compreender que esta é uma escala logarítmica, em que um meio com pH 5 possui acidez dez vezes mais do que um que tem pH 6; e o pH 4 é 100 vezes mais ácido do que o pH 6.

A influência do pH sobre o crescimento dos microrganismos está situada em três níveis: no meio, na permeabilidade da membrana e na atividade metabólica.

Certos nutrientes podem ficar indisponíveis no meio de cultura em função do equilíbrio iônico. Em pHs ácidos, por exemplo, o íon magnésio forma complexos insolúveis; o mesmo acontece com os íons de zinco, cálcio e os férricos em pHs básicos. Sob tais formas, estes íons, que são indispensáveis como cofatores de enzimas, são dificilmente utilizáveis.

As variações nas concentrações de íons  $H^+$  e  $OH^-$  também afetam a permeabilidade da membrana celular. Em meio ácido as *permeases* catiônicas se saturam de íons hidrogênio, o que limita ou anula o transporte de cátions indispensáveis ao metabolismo celular. Em meio alcalino, são os íons hidroxilas que saturam a membrana, impedindo a transferência de ânions.

As reações enzimáticas possuem um pH ótimo de atividade. Toda variação do pH citoplasmático provoca uma diminuição da atividade enzimática e, portanto, afeta a velocidade de crescimento dos microrganismos.

#### 4.3.7.1. Equipamentos e materiais

- pHmetro (medidor de pH);
- Solução tampão pH 7 para calibração do pHmetro;
- Solução tampão pH 4 para calibração do pHmetro;
- Piceta com água destilada.

A Figura 24 mostra a aferição do pH do hidrolisado.



Figura 24. pHmetro.

#### 4.3.8 Acidez Total (016/IV- IAL)

Consiste na determinação da quantidade de um ácido com o emprego de uma solução titulada de uma base. Assim, por exemplo, pode-se determinar a quantidade de ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ), existente em uma solução de NaOH de concentração conhecida. As medidas físicas são envolvidas de duas maneiras: na identificação do ponto de equivalência (*viragem*) e na medida da quantidade do reagente consumido.

O ponto de equivalência ou ponto final da titulação é indicado por meio de um *indicador* que proporciona uma mudança de coloração característica. Assim, por exemplo, a fenolftaleína é um indicador que na presença de um ácido é incolor e na presença de uma base é vermelha.

Se colocarmos uma quantidade mínima de fenolftaleína numa solução contendo um ácido, esta solução permanecerá incolor; e, se a seguir, gotejarmos lentamente nesta solução uma outra solução contendo uma base, verificar-se-á uma reação de neutralização.

Enquanto o ácido ainda estiver em excesso, a solução continuará incolor; mas, tão logo termine o ácido, aparecerá a cor vermelha, indicando a presença da base. Deste modo, a fenolftaleína indicou o término da reação pela mudança de incolor para vermelho, como mostra a Figura 25.

#### 4.3.8.1. Equipamentos e materiais

- Pipetas volumétricas de 2 mL e 5 mL;
- Bureta de 25 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Proveta de 50 mL;
- Suporte de bureta com garra;
- Becker de 50 mL.

#### 4.3.8.2. Reagentes

- Solução 0,1 N de hidróxido de sódio (NaOH) fatorada
- Indicador de acidez fenolftaleína a 1%

#### 4.3.8.3. Procedimento

Pesar, em becker de 50 mL 2g da amostra se o produto a ser analisado for de acidez elevada como o vinagre; ou 10g se o produto a ser analisado for de baixa acidez como o vinho;

- Transferir, quantitativamente, para um erlenmeyer de 250 mL:
- Adicionar 50 mL de água destilada e 2 à 3 gotas do indicador fenolftaleína;
- Titular com a solução de hidróxido de sódio até o surgimento da cor rosa.



**Figura 25.** Ponto de Equivalência ou Ponto Final da Titulação.

#### 4.3.8.4. Cálculos

a) Em meq/Kg

$$\text{Acidez (meq/Kg)} = \frac{V \times N \times f \times 1000}{P} \quad (\text{Eq. 4})$$

b) Em grama /100 g

$$\text{Acidez (g de ácido/100g)} = \frac{V \times N \times f \times Eq}{10 \times P} \quad (\text{Eq. 5})$$

$V$  = Volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em mL

$N$  = Normalidade da solução de hidróxido de sódio (0,1N)

$f$  = Fator da solução de hidróxido de sódio

$P$  = Peso da amostra em gramas

$Eq$  = Equivalente grama do ácido a ser adotado para expressar o resultado

Equivalente grama dos principais ácidos em alimentos e bebidas:

- Ácido acético = 60,05
- Ácido cítrico = 64,02
- Ácido tartárico = 75,02
- Ácido láctico = 90,08
- Ácido málico = 67,07
- Ácido láurico = 200,00
- Ácido oléico = 282,45
- Ácido benzóico = 122,10
- Ácido glicônico = 19

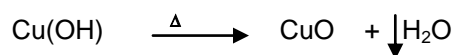
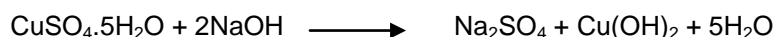
#### 4.3.9 Determinação dos Açúcares Redutores (A.R) pelo Método Eynon-Lane

Consiste na redução do  $\text{Cu}^{++}$  existente na solução A de Fehling para  $\text{Cu}^+$  em meio alcalino com a consequente oxidação dos Açúcares Redutores.

Teoricamente o processo de oxidação pode apresentar diferentes estequiometrias de acordo de acordo com o grau de oxidação sofrido e da natureza dos Açúcares Redutores presentes (aldose ou cetose). Assim temos desde 2 moles de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (500g) por mol de A.R. (180g) até 12 moles de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3000g) por mol de A.R. (180g). Na prática, nas condições usadas, temos 5 moles de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1250g) para cada mol de A.R. (180g).

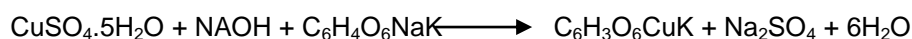


Se colocássemos diretamente o  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em presença de  $\text{NaOH}$  haveria precipitação do  $\text{Cu}^{++}$ , segundo a reação:



Para evitar a precipitação direta do  $\text{Cu}^{++}$  em meio alcalino adiciona-se ao meio o Tartarato Duplo de Sódio e Potássio ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK}$  – Sal de Seignette ou de Rochelle).

Em presença de uma substância oxigenada orgânica não haverá formação de um precipitado de  $\text{CuO}$  e sim a formação de um sal complexo (chamado de cupri-tartarato) que juntamente com o  $\text{NaOH}$  vai formar o Licor de Fehling, segundo a equação química abaixo:



Para tornar o licor mais sensível, deixa-se para misturar as soluções A e B na hora da titulação. O  $\text{Cu}^{++}$  tem cor azul ao passo que o  $\text{Cu}^+$  tem cor vermelho-tijolo. Por esta razão durante a titulação a cor do meio vai passando gradualmente de azul para vermelho ou, em algumas soluções mais turvas, para marrom. Para um melhor reconhecimento do final da reação usa-se o Azul de Metileno a 1%.

O aquecimento visa precipitar o  $\text{Cu}^+$  na forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  que será mais quantitativo que sob a forma de hidróxido por ser o óxido menos solúvel.

A solução A terá  $69,28 \times 10^{-3}\text{g}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  por mL. Na preparação do Licor de Fehling são usados 5 mL da solução A. Portanto, usando a estequiometria citada anteriormente (1250 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  / 180g de A.R), o cobre existente nos 5 mL do Licor de Fehling serão reduzidos por 0,05g de A.R. de acordo com os seguintes cálculos:

$$\begin{array}{rcl} 1250\text{g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & - & 180\text{g A.R.} \\ 346,4 \times 10^{-3}\text{g (5 mL da solução A)} & - & X \end{array}$$

$$X \cong 0,05\text{g}$$

Chama-se Açúcares Redutores ou simplesmente AR a todos os açúcares capazes de reduzir o cobre (Cu) de uma solução cupro-alcalina do estado cúprico ( $\text{Cu}^{++}$ ) para o cuproso ( $\text{Cu}^+$ ).

Dentre esses açúcares destacam-se as aldoses e as cetoses. Nas aldoses, o poder redutor decorre da presença da carbonila aldeídica que se oxida em condições brandas. Nas cetoses decorre da presença da carbonila cetônica  $\alpha$ -hidroxilada que pode existir como tautômero enediol que se oxida em condições brandas dando  $\alpha$ -dicetonas.

Nos frutos, os açúcares predominantes são a glicose (aldoexose) e a frutose (cetoexose). Em outros vegetais, como a cana-de-açúcar e a beterraba, predomina a sacarose (dissacarídeo), que é um açúcar não redutor.

Outros dissacarídeos importantes, como a lactose (açúcar do leite) e maltose (resíduo de hidrólise do amido) são açúcares redutores.

Entre os diversos métodos para se determinar A.R. está o de Eynon-Lane. Este método consiste em se determinar o volume necessário, da solução a analisar, para precipitar completamente todo o cobre que está contido numa alíquota fixa do chamado Licor de Fehling (solução A + solução B).

A glicose e a frutose presentes reduzem o íon  $\text{Cu}^{++}$  do Licor de Fehling a  $\text{Cu}^+$  desaparecendo a cor azul escura característica do Licor e aparecendo um precipitado vermelho de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Para evidenciar melhor a *viragem* adiciona-se 2 à 3 gotas de azul de metileno a 1%.

A reação detalhada do processo é extremamente complexa. Entretanto, nas condições que são usadas no método, cada 180g de A.R. reduz todo o cobre existente em 125g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

#### 4.3.9.1. Preparo do Licor ou Solução de Fehling.

O licor ou solução de Fehling é obtido na hora da titulação pela mistura das Soluções A e B.

- **Solução A:** Obtida pela dissolução de 34,639g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em água destilada até 500 mL.
- **Solução B:** Obtida pela dissolução de 173g de Tartarato Duplo de Sódio e Potássio e 50g de NaOH em água destilada suficiente para completar 500 mL. A Figura 26 mostra os preparados com soluções de Fehling A e B.



Figura 26. Soluções de Fehling A e B

#### 4.3.9.2 Cálculos

Tomando como exemplo a determinação de A.R. de uma amostra de mel de abelhas:

- A diluição da amostra deve ser feita de forma a se obter uma solução com concentração de 0,25 a 0,8g de A.R. /100 mL.

No exemplo pode-se adotar a diluição de 2g de mel por 500 mL da solução.

- Admitindo que seja gastos  $V$  mL da solução de mel para reduzir todo o Cu existente no volume usado do Licor de Fehling, temos:

$$\begin{array}{rcl} V \text{ mL} & - & 0,05\text{g} \\ 500 \text{ mL} & - & y \text{ g} \end{array}$$

Onde  $y$  = total de Açúcares Redutores existentes nos 500 mL da solução de mel (expresso em gramas).

- Para encontrar o percentual de A.R. na amostra de mel temos:

$$\%A.R.(g/100g) = (y/P_m) \times 100 \quad P_m = \text{Peso do mal (no caso 2)}$$

$$P_m = \text{Peso do mel (no caso 2g)}$$

$$\%A.R.(g/100g) = (y / P_m) \times 100 \quad \%A.R.(g/100g) = [(500 \times 0,05) / (V \times P_m)] \times 100$$

$$\%A.R.(g/100g) = \frac{25}{V \cdot P_m} \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde:

$V$  = Volume gasto na titulação

$P_m$  = Peso da amostra ( $\cong$  2g)

#### 4.3.9.3 Equipamentos e materiais

- Balança de precisão;
- Bureta do 25 mL com torneira;
- Suporte de bureta;
- Erlenmeyer de 250 mL boca larga;
- Pipetas volumétricas de 5 mL;
- Balão volumétrico de 500 mL;
- Conta-gotas;
- Bico de Bunsen, com tripé e tela de amianto;
- Pinça para erlenmeyer;
- Funil de vidro;
- Papel de filtro;
- Becker de 250 mL;
- Becker de 50 mL;
- Proveta de 50 mL;
- Pérolas de vidro.

#### 4.3.9.4 Reagentes

- Solução de Fehling A;
- Solução de Fehling B;
- Solução aquosa de Azul de Metileno a 1%.

#### 4.3.9.5 Procedimento para produtos diluído, como sucos e mostos

Para o preparo do mosto, muitas vezes é necessário diluir a elevada concentração de sólidos solúveis para se obter a quantidade ideal de açúcares. Feita a diluição, a metodologia analítica para determinação de açúcares redutores compreende as seguintes etapas:

- Filtrar, desprezando os primeiros 20 mL, cerca de 100 mL da amostra;
- Diluir, convenientemente, de acordo com o produto a ser analisado:
  - Diluição de 1:50 (5/250 mL) se o produto possuir cerca de 15 g/100 mL de A.R., fator de diluição  $f = 50$ ;
  - Diluição de 1:40 (5/200 mL) se o produto possuir cerca de 10 g/100 mL de A.R. fator de diluição  $f = 40$ ;
  - Diluição de 1:25 (10/250 mL) se o produto possuir cerca de 7 g/100 mL de A.R. fator de diluição  $f = 25$ ;

- Diluição de 1:20 (5/100 mL) se o produto possuir cerca de 5 g/100 mL de A.R. fator de diluição  $f = 20$ ;

- Pipetar 5 mL da solução A e 5 mL da solução B para um erlenmeyer de 250 mL;
- Colocar 2 a 4 pérolas de vidro para servir como núcleo de ebulição;
- Encher a bureta com a solução a ser analisada;
- Acender o bico de Bunsen;
- Verter cerca de 15 mL da solução no erlenmeyer;
- Aquecer a mistura até ebulição. Manter por dois minutos;
- Adicionar 2 a 3 gotas de Azul de Metileno, tendo cuidado para que ele não escorra pelas paredes do erlenmeyer, o que dificultaria a visualização do ponto de *viragem*;
- Proceder a titulação gota a gota sob ebulição até o ponto de *viragem* (mudança da cor azul para vermelho tijolo). Anotar o volume gasto ( $V_1$ );
- Repetir o processo passo a passo, com o cuidado de verter da bureta nesta segunda titulação um volume de solução igual a  $V_1 - 1$  mL;
- Continuar os passos seguintes, tendo o cuidado de proceder à titulação gota a gota lentamente;
- Anotar o volume gasto ( $V_2$ )
- O teor de A.R. é dado por:

$$A.R. (g/100mL) = \frac{5}{V_2} \times f \quad (Eq.7)$$

Onde:

$V_2$  = Volume gasto na titulação

$f$  = Fator de diluição

As Figuras 27, 28 e 29 mostram as etapas de diluição e titulação dos mostos.



**Figura 27.** Solução Diluída.



**Figura 28.** Titulação.

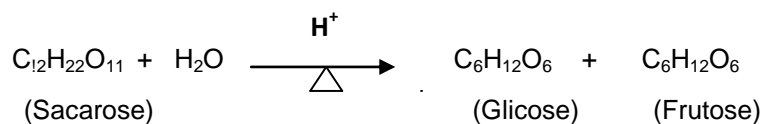


**Figura 29.** Ponto de *Viragem*.

#### 4.3.10 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (A.R.T.) pelo Método Eynon-Lane

Consiste na determinação dos Açúcares Redutores originalmente presentes na amostra a ser analisada mais os Açúcares Redutores provenientes da hidrólise da sacarose. A soma desses açúcares passa a ser denominada de Açúcares Redutores Totais.

Ao se acidificar e aquecer uma solução aquosa contendo sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), esta sofrerá uma decomposição (hidrólise) produzindo glicose e frutose, segundo a equação seguinte:



Com já foi visto anteriormente, a glicose e frutose existente originalmente em uma amostra são chamadas em conjunto de açúcares redutores ou simplesmente A.R. Ao se promover a inversão da sacarose, existente em uma amostra iremos produzir mais glicose e frutose que irão se somar aos teores destas substâncias originalmente presentes e serão chamados, agora coletivamente, de Açúcares Redutores Totais ou A.R.T.

Estequiometricamente, cada 342g de sacarose presentes na amostra, dão origem a 360g de A.R. (Glicose + Frutose). Conseqüentemente o teor de A.R.T. de uma solução será igual a:

$$A.R.T. = A.R. + \text{Sacarose} \times (360/342)$$

$$A.R.T. = A.R. + \text{Sacarose} \times 1,053 \quad (Eq.8)$$

A hidrólise da sacarose pode também ser processada enzimaticamente sob a ação da invertase, enzima produzida comercialmente a partir de células de levedura.

#### **4.3.10.1 Equipamentos e materiais**

- Balança de precisão;
- Bureta do 25 mL com torneira;
- Suporte de bureta;
- Erlenmeyer de 250 mL boca larga;
- Pipetas volumétricas de 5 mL e 10 mL;
- Balão volumétrico de 500 mL;
- Conta-gotas;
- Bico de Bunsen, com tripé e tela de amianto;
- Pinça para erlenmeyer;
- Funil de vidro;
- Papel de filtro;
- Becker de 250 mL;
- Becker de 50 mL;
- Proveta de 50 mL;
- Pérolas de vidro.

#### **4.3.10.2 Reagentes**

- Solução de Fehling A;
- Solução de Fehling B;
- Solução aquosa de Azul de Metileno a 1%;
- Solução de Ácido Clorídrico 1:1;
- Solução de NaOH a 26%.

#### **4.3.10.3 Procedimento para produtos diluídos, como sucos e mosto**

Mostos diluídos facilitam a fermentação, tornando-a mais rápida e completa. Além disso, a multiplicação do fermento é favorecida, devido a maior transferência de oxigênio que ocorre no meio. A Figura 30 mostra a etapa de hidrólise das amostras para determinação dos açúcares totais. O procedimento que antecede a hidrólise da sacarose é o mesmo aplicado à determinação dos açúcares redutores:





**Figura 30.** Hidrólise da amostra.

- Filtrar, desprezando os primeiros 20 mL, cerca de 100 mL da amostra;
- Transferir, para balão volumétrico, alíquota de 5 ou 10 mL de acordo com o produto a ser analisado:
  - Alíquota de 5 mL para balão de 250 mL, se o produto possuir cerca de 15 g/100 mL de A.R.T.  
Diluição 1:50,  $f = 50$ ;
  - Alíquota de 5 mL para balão 200 mL se o produto possuir cerca de 10 g/100 mL de A.R.T.  
Diluição 1:40,  $f = 40$ ;
  - Alíquota de 10mL para balão de 250 mL se o produto possuir cerca de 7 g/100 mL de A.R.T.  
Diluição 1:25,  $f = 25$ ;
  - Alíquota de 5 mL para balão de 100 mL, se o produto possuir cerca de 5 g/100 mL de A.R.T.  
Diluição 1:20,  $f = 20$ ;
- Adicionar 50 mL de água destilada;
- Adicionar 10 mL da solução de Ácido Clorídrico;
- Aquecer a 65-70°C por 10 minutos;
- Deixar esfriar espontaneamente;
- Neutralizar com a solução de NaOH em presença de fenolftaleína (vira para rosa);
- Completar o volume com água destilada até aferição do balão;
- Pipetar 5 mL da solução A e 5 mL da solução B para um erlenmeyer de 250 mL;
- Colocar 2 à 4 pérolas de vidro para servir como núcleo de ebulição;
- Encher a bureta com a solução a ser analisada;
- Acender o bico de Bunsen;
- Verter cerca de 15 mL da solução no erlenmeyer;
- Aquecer a mistura até ebulição. Manter por dois minutos;

- Adicionar 2 a 3 gotas de Azul de Metileno, tendo cuidado para que ele não escorra pelas paredes do erlenmeyer, o que dificultaria a visualização do ponto de *viragem*;
- Proceder a titulação gota a gota sob ebulição até o ponto de *viragem* (mudança da cor azul para vermelho tijolo). Anotar o volume gasto ( $V_1$ );
- Repetir o processo passo a passo, com o cuidado de verter da bureta nesta segunda titulação um volume de solução igual a  $V_1 - 1$  mL;
- Continuar os passos seguintes, tendo o cuidado de proceder à titulação gota a gota lentamente;
- Anotar o volume gasto ( $V_2$ )

O teor de A.R. é dado por:

$$A.R.T.(g/100mL) = \frac{5}{V_2} \times f \quad (Eq.9)$$

Onde:

$V_2$  = Volume gasto na titulação

$f$  = Fator de diluição

#### 4.3.11 Determinação da Perda por Dessecação (umidade) – Secagem em Estufa a Vácuo (013/IV-IAL)

##### 4.3.11.1 Material

Estufa a vácuo, bomba de vácuo, balança analítica, espátula de metal, pinça de metal, dessecador com sílica gel e capsula de porcelana ou de platina de 8,5 cm de diâmetro.

##### 4.3.11.2 Procedimento

Pesa-se de 2 a 10 g da amostra em capsula, previamente tarada, e a aquece durante 6 horas em estufa a vácuo a 70°C, sob pressão reduzida  $\leq 100$  mm de mercúrio (13,3 kPa) . Resfria-se em dessecador até a temperatura ambiente. Pesa-se novamente. Repete-se a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante.

*Nota:* podem ser utilizadas capsulas de outros metais resistentes ao calor desde que as cinzas obtidas não sejam empregadas para posterior análise de metais.

#### 4.3.11.3 Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{Umidade ou Substâncias Voláteis a } 70^{\circ}\text{C por cento m/m} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde:

**N** = no de gramas de umidade (perda de massa em g)

**P** = no de gramas da amostra

#### 4.3.12 Determinação de Fibras (MÉTODO DE HENNEMBERG, 1864)

Fibra é o resíduo orgânico obtido em certas condições de extração além da celulose, lignina e hemicelulose, areia e outras substâncias minerais presas aos tecidos celulares. O teor de fibras em alimentos varia de acordo com a sua origem. As frutas e seus produtos podem apresentar de 0,1 a 6,8%; leguminosas, de 2 a 4%; cereais e seus produtos de 0 a 2,2%. O método abordado simula “*in vitro*” o processo da digestão “*in vivo*”, constando fundamentalmente de uma digestão em meio ácido, seguida por uma digestão em meio alcalino. O resíduo destas digestões representa a “fibra bruta” e o resíduo da incineração desse material a “fração fibra” do produto analisado. Caso não se tenha a amostra desengordurada da análise de lipídeos, utiliza-se o procedimento descrito pela AACC (1975). Pesar cerca de 5 g de amostra seca e adicionar 10 mL de solução álcool: éter (1:1). Agitar em vortex por 1 min. Filtrar em papel de filtro qualitativo. Repetir o processo por no mínimo 3 vezes. Manter o resíduo exposto ao ar por um certo período de tempo para que se evaporem os solventes orgânicos residuais.

##### 4.3.12.1 Procedimento

Pesa-se, em um becker de 200 mL, cerca de 1g de amostra desengordurada e adicionar 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25%. Deixar em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Filtrar em papel de filtro, lavando o material com 25 mL de água destilada quente. Transferir o material retido no papel de filtro para um becker de 200 mL com a ajuda de 50 mL de NaOH 1,25%. Deixar em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Filtrar em papel de filtro quantitativo previamente tarado, lavar com 100 ml de água quente e secar em estufa a 100°C por aproximadamente 2 horas. Pesar o papel com resíduo e anotar o peso. Levar à mufla em cadinho previamente tarado a 550°C para determinar a fibra bruta.

#### 4.3.12.2 Cálculo

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \left( \frac{\text{papel com resíduo seco} - \text{papel}}{\text{massa da amostra}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\% \text{ Fibra Real} = \% \text{ Fibra Bruta} - \% \text{ Cinzas} \quad (\text{Eq. 12})$$

#### 4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização das hidrólises, foram realizados 18 ensaios, sendo estes divididos em 9 ensaios com a utilização de ácido sulfúrico e 9 ensaios com o uso de enzimas amilolíticas. Para ambos os processos foram pesados 50g de cada variedade de farinha para o preparo o preparo dos xaropes, seguindo as proporções da metodologia utilizada por ABUD, 1997.

##### 4.4.1 Hidrólise Ácida

Como é sabido, a fermentação das matérias primas amiláceas só é possível após a quebra da molécula do amido através de uma hidrólise prévia. Este processo dá origem a um xarope rico em glicose, utilizado nos preparos de cultura líquido para cultivo em Erlenmeyers. Seu preparo, seguindo a metodologia utilizada por Gonçalves (2007), é descrito a seguir:

- » Pesou-se 50g de farinha de cada variedade de mandioca;
- » Adicionou-se 250mL de uma solução de ácido sulfúrico 1% em Erlenmeyers de 500mL (foram utilizados 18 Erlen);
- » Em seguida, os Erlen contendo farinha e ácido sulfúrico foram autoclavados por um período de 1h a 1,5 atm;
- » Depois de autoclavado, o material hidrolisado foi filtrado para retirada de resíduo e, em seguida, resfriados à temperatura ambiente;
- » Após resfriamento, os hidrolisados tiveram pH ajustados para 4,5 com solução de NaOH 26%.

##### 4.4.2 Hidrólise Enzimática

Como mostra a Figura 31, para o preparo dos xaropes de farinha, utilizou-se, inicialmente, a enzima  $\alpha$ -amilase em uma suspensão de 50g de cada variedade de farinha em solução de  $\text{CaCl}_2$ .

Seguindo a metodologia aplicada por ABUD (1997), com adaptações, para o preparo do xarope de farinha de mandioca, utilizou-se:

- » 50g de cada uma das 3 variedades de farinha;

- » 0,03g de  $\alpha$ -amilase BioChemika, fornecida pela SIGMA;
- » Solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01M.

• Procedimento:

- a. Em um Becker de 1000mL, suspendia-se a farinha de mandioca em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01M, de modo a se ter aproximadamente 150g/L de suspensão, com auxílio de um bastão para agitação constante;
- b. Após homogeneização, adicionava-se a enzima e ajustava o pH da suspensão entre 6,0 e 6,5, utilizando-se solução de NaOH 2N;
- c. Aquecia-se a suspensão até a temperatura de 85°C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos. Em seguida, levava-se à ebulição por 5 minutos;
- d. A suspensão era filtrada à vaco, ainda quente, utilizando papel xarope;
- e. Do filtrado, recolhia-se uma amostra para dosagem de açúcares redutores (A.R.) e de açúcares redutores totais (A.R.T.), segundo metodologia descrita nos itens 4.3.9 e 4.3.10, respectivamente.



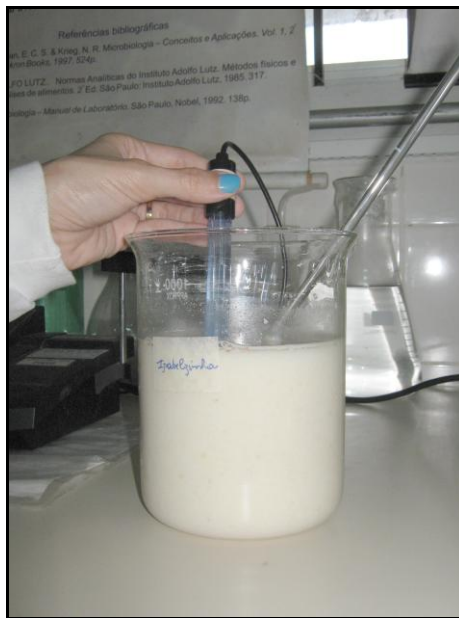
**Figura 31-** Preparo do xarope

#### **4.4.2.1. Hidrolisado de Farinha de Mandioca**

O hidrolisado de farinha de mandioca, utilizado nos preparos dos meios de cultivo em Erlenmeyers, era realizado de acordo com o seguinte procedimento:

- a. Ajustava-se o pH de um certo volume de xarope de farinha de mandioca em 4,2, utilizando-se solução de HCl 2N, como mostra a Figura 32;

- b. Transferiam-se 125mL de xarope para Erlenmeyers de 250mL, adicionando-se em cada frasco 0,6mL de glicoamilase fúngica ( neste trabalho, utilizou-se amiloglicosidase BioChemika (SIGMA));
- c. Os Erlenmeyers eram tampados com rolhas e incubados a 45°C e 150rpm, por 16h;
- d. Após este tempo recolhia-se uma amostra pra dosagem de glicose, segundo metodologia descrita no item 4.3.5.



**Figura 32-** Ajuste do pH

#### **4.4.3 Fermentação Etanólica**

As etapas que compreendem o processo de fermentação dos mostos hidrolisados tiveram início com a propagação das células das leveduras em meio sintético YPD (meio rico). Após o período de 24h de fermentação neste meio, em estufa a 30°C, as células foram separadas por meio de centrifugação. O material suspenso foi então transferido para os mostos e levados para estufa por 48h.

Durante esse período, os frascos foram pesados em balança analítica de precisão para avaliar a eficiência fermentativa através da liberação de CO<sub>2</sub>. Também foram medidas as concentrações de glicose por meio dos métodos GLUCOX e Enyon Lane, descritos no item 4.3.5. Cessada a fermentação, os mostos foram submetidos à análise de determinação do teor alcoólico pelo método do ebuliômetro (item 4.3.6).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS DE MANDIOCA

As farinhas de mandioca utilizadas foram caracterizadas de acordo com vários parâmetros tais como: teor de óleos e gorduras (TOG), proteínas, teor de amido, umidade e cinzas. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para as três variedades utilizadas.

**Tabela 5.** Composição química da farinha de mandioca.

<i>Farinha</i>	<i>Varied. ST</i>	<i>Varied. SE</i>	<i>Varied. IS</i>	<i>Varied. da Literatura</i>
TOG (%)	0,24	0,46	0,48	0,30 <sup>a</sup>
Proteínas (%)	1,38	1,32	1,34	2,60 <sup>a</sup>
Amido (%)	80,35	74,01	77,95	Min 70 <sup>b</sup> - 88,34 <sup>a</sup>
Massa Seca (%)	91,81	92,24	92,10	
Umidade (%)	8,19	7,76	7,9	max. 13 <sup>b</sup>
pH	4,63	4,82	4,72	
Acidez (mL NaOH/100g)	2,21	1,88	2,13	Max - 3 <sup>b</sup>
ART (%)	35,91	39,23	37,50	
AR (%)	0,36	0,42	0,37	0,20 <sup>a</sup>
Cinzas	0,74	1,12	1,16	Max. - 1,5 <sup>b</sup>
Fibra Bruta	2,15	2,21	2,40	2,70 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fonte: Ostrowski et al., 2006

<sup>b</sup>. Fonte: Brasil, 1978.

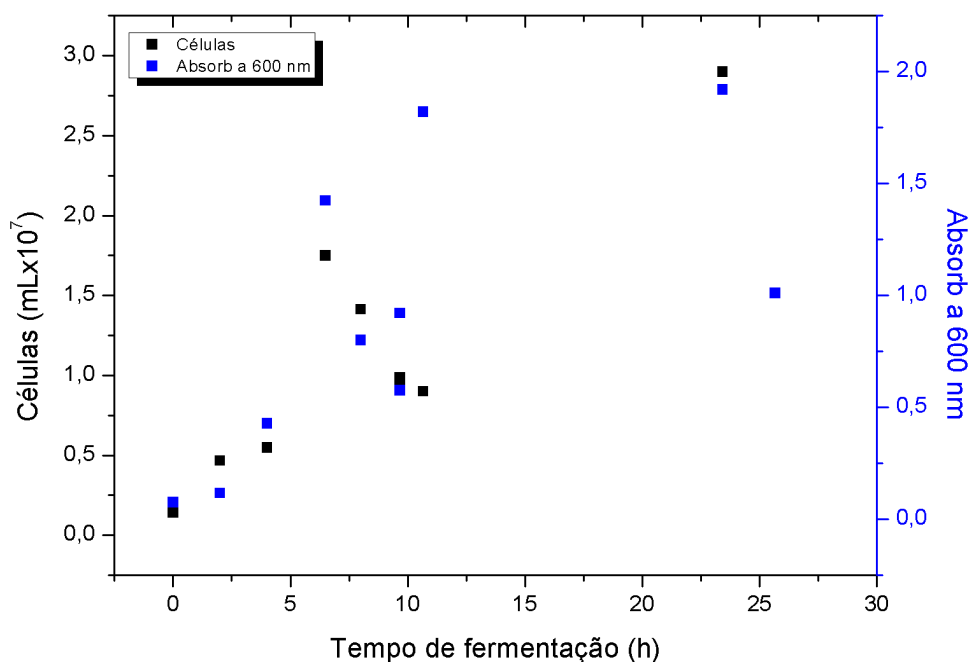
De acordo com a Tabela 5, observou-se que, em relação aos valores de cinzas, acidez e carboidratos que todas as amostras estão de acordo com os padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira para farinhas de mandioca. O teor de amido das variedades de farinha utilizadas neste trabalho foram um pouco menores do que os valores da literatura, porém, a concentração de amido varia com a espécie de mandioca e como não foram encontrados outros estudos com essas variedades, a comparação pode não ser exata.

Também de acordo com resultados das determinações físico-químicas das três variedades, apresentados na Tabela 5, os valores para massa seca apresentaram-se bem maiores que os da literatura. Com relação às demais análises, não se observam diferenças

significativas. Segundo Ostrowski et al. (2006) o amido presente na mandioca é praticamente puro em amilose e amilopectina, assim basta sua conversão eficiente em glicose para se conduzir uma boa fermentação. Assim, as variedades estudadas apresentaram teor de amido suficiente para a realização da conversão ácida e enzimática, bem como condução de eficientes fermentações etanólicas.

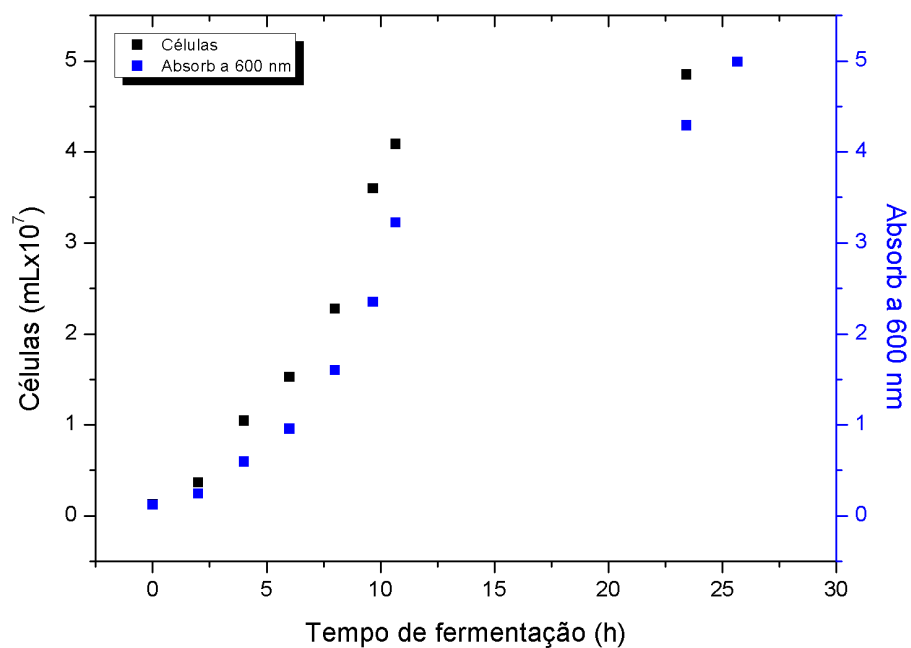
## 5.2 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DAS LEVEDURAS

Após a determinação da composição das variedades de farinhas foi necessário realizar ensaios que permitissem a verificação da viabilidade das leveduras selecionadas para realizar as fermentações. As figuras de 27 a 30 mostram o crescimento das leveduras testadas.

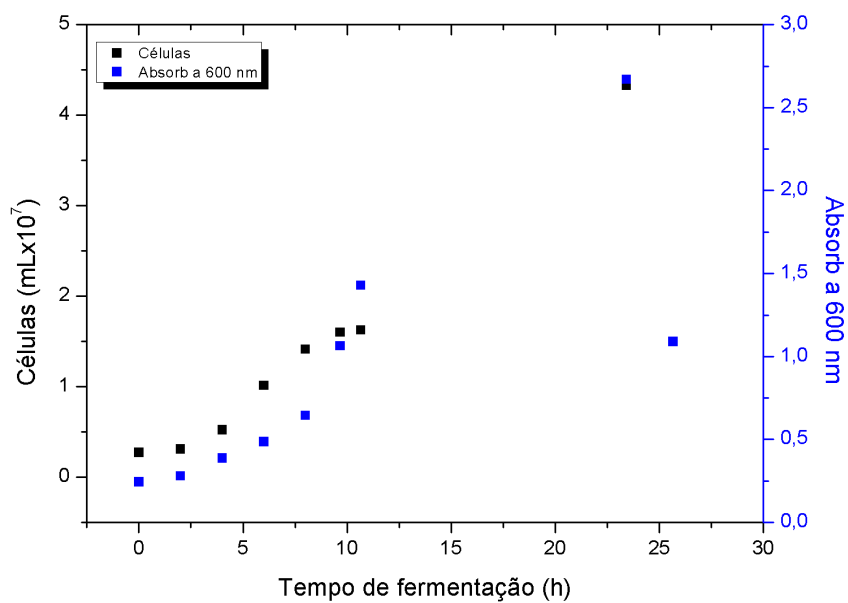


**Figura 33.** Crescimento da levedura UPSA C3 (12) em meio sintético.





**Figura 34.** Crescimento da levedura UPSA C1 (10) em meio sintético.



**Figura 35.** Crescimento da levedura do fermento comercial em meio sintético.

As figuras de 33 a 35 mostram que as leveduras selecionadas para realizar as fermentações etanólicas cresceram bem no período de 24 horas mostrando-se viáveis para fermentar o hidrolisado de farinha de mandioca, sendo a levedura C1 (10) a que obteve maiores taxas de crescimento. Como o crescimento de todas as leveduras mantiveram uma velocidade estável de crescimento, não foi necessário acompanhá-lo por mais que 24 horas.

### 5.3 HIDRÓLISE DA FARINHA DE MANDIOCA

O rendimento teórico da hidrólise do amido foi obtido pela seguinte equação de acordo com Santana (2007):

$$Y_{teórico} (g/L) = \frac{180}{162} \times C_{amido} \quad (Eq. 13)$$

Em que: **180** e **162** são a massa molecular da glicose e a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido, respectivamente. **C** é a concentração de amido e **Y** é o rendimento teórico do processo de hidrólise do amido.

A partir dos valores de rendimento foi calculada a eficiência da hidrólise pela seguinte equação:

$$Eficiência da Hidrólise (\%) = \frac{Y_{real}}{Y_{teórico}} \times 100 \quad (Eq. 14)$$

Em que: **Y<sub>real</sub>** é a concentração de glicose obtida após a hidrólise e

**Y<sub>teórico</sub>** é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L).

A Tabela 6 mostra os rendimentos teóricos e reais das hidrólises ácida e enzimática além da eficiência de hidrólise para as três variedades de farinha de mandioca.

**Tabela 6.** Rendimentos das hidrólises

<b>Variedades-Hidrólise</b>	<b>Yteorico (g/L)</b>	<b>Yreal (g/L)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
Variedade ST-AC	278,75	158,37	56,81
Variedade SE-AC	264,46	160,75	60,78
Variedade IS_AC	273,22	163,85	59,96
Variedade ST-Enz	278,75	258,02	92,56
Variedade SE-Enz	264,46	195,90	74,07
Variedade IS-Enz	273,22	191,33	70,02

Pela Tabela 6, pode-se observar que os rendimentos reais e as eficiências de hidrólise foram melhores quando foi feita a hidrólise enzimática do que com a hidrólise ácida. Como podia-se esperar, as eficiências da hidrólise enzimática foram superiores, pois as enzimas quebraram as moléculas de amido de modo específico e seletivo, enquanto que a hidrólise ácida tende a gerar açúcares não fermentescíveis, contribuindo para queda do rendimento real.

A variedade de farinha com melhor eficiência enzimática foi a Variedade-ST, sendo explicado pelo fato dessa farinha ter maior quantidade de amido que as enzimas usadas conseguiram hidrolisar, como pode ser observado na Tabela 5. Assim maiores conversões foram geradas com essa variedade de mandioca. A hidrólise mais eficiente por parte das enzimas também torna-se um excelente resultado, pois diminui os custos envolvidos no gasto das enzimas. Já com a hidrólise ácida, por não ser específica, as eficiências das hidrólises utilizando as 3 diferentes variedades mostraram-se semelhantes.

#### 5.4 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação foram realizados em 48 horas tanto para os hidrolisados ácidos, quanto para os hidrolisados enzimáticos. Para as fermentações com hidrolisados ácidos, o pH foi ajustado para 4,5 e a fermentação ocorreu de forma espontânea à temperatura de 38°C em estufa. Os volumes úteis para estas fermentações foram em torno de 400mL. Já para as fermentações com hidrolisados enzimáticos, o pH foi ajustado para 4,2 de acordo com a metodologia aplicada por ABUD, 1997. Essas fermentações foram conduzidas em agitação constante de 150rpm por 16h, apresentando volumes úteis de 125mL.

#### 5.4.1 Hidrólise ácida

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para a levedura C3 (12) estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Teor alcoólico para levedura C3 (12)

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	7,5
Variedade SE	8
Variedade IS	7,5

Pela Tabela 7, pode-se observar que houve pouca diferença no total de álcool produzido pela levedura C3 (12), isso se dá devido a semelhança eficiência de hidrólise como mostrado na Tabela 6. A farinha da variedade ST possui uma quantidade de amido superior as demais variedades, porém como as eficiências de hidrólise foram bem parecidas esse fato não interferiu nos resultados.

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para a levedura C1 (10) estão apresentados na Tabela 8. O mesmo que aconteceu para levedura C3 (12), ocorreu no caso da levedura C1 (10), não houve diferença significativa nos níveis de álcool produzido a partir das diferentes variedades de farinha.

**Tabela 8.** Teor alcoólico a levedura C1 (10)

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	8
Variedade SE	7,7
Variedade IS	7,5

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para o fermento comercial estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Teor alcoólico para fermento comercial

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	8,3
Variedade SE	8,1
Variedade IS	8,3

Observa-se pela Tabela 9 que o fermento comercial mostrou-se bem adaptado às variedades de farinhas utilizadas neste trabalho, mostrando teores de álcool um pouco superiores aos obtidos pelas outras duas leveduras. Isso provavelmente ocorreu devido à procedência do fermento comercial, derivado de leveduras próprias para fermentação alcoólica e, também, devido à concentração de glicose adequada, não inibindo assim o metabolismo das leveduras.

#### **5.4.2 Hidrólise enzimática**

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para a levedura C3 (12) estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Teor alcoólico para levedura C3 (12)

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	10,7
Variedade SE	11,4
Variedade IS	11

Pela Tabela 10, pode-se observar que os valores de teor alcoólico foram semelhantes para as três variedades de farinha, porém a farinha de Variedade-ST teve a menor produção de etanol. Se for observada a Tabela 6, essa variedade foi a que obteve maior eficiência de hidrólise do processo enzimático e, portanto, de todo o ensaios realizados. O que pode ter acontecido foi uma inibição do metabolismo da levedura em virtude da elevada concentração de açúcar inicial.

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para a levedura C1 (10) estão apresentados na Tabela 11. Observando-se a Tabela 11, pode-se ver um comportamento da levedura C1 (10) bastante semelhante com os dados da Tabela 10 para a levedura C3 (12).

**Tabela 11.** Teor alcoólico a levedura C1 (10).

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	11,0
Variedade SE	11,6
Variedade IS	11,2

Os resultados das fermentações com relação ao teor alcoólico para as três variedades de farinhas para o fermento comercial estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Teor alcoólico para fermento comercial.

<i>Variedade de Farinha</i>	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>
Variedade ST	10,5
Variedade SE	10,9
Variedade IS	10,7

Para os ensaios com fermento comercial, na Tabela 12 pode-se observar que a variedade ST teve novamente o menor valor de teor alcoólico e que todas as variedades tiveram teores menores que os das leveduras C1 (10) e C3 (12). Nesse caso, pode-se explicar, pois o fermento parece ser mais susceptível a intoxicação pelo etanol, não mostrando o mesmo rendimento das demais leveduras. No caso da hidrólise enzimática o mais interessante seria realizar uma diluição do hidrolisado para diminuir a concentração de açúcar inicial, pois quanto maior a quantidade de açúcar maior o teor alcoólico, porém teores de etanol superiores a 10% tendem a aumentar a toxicidade do vinho. Outros ensaios devem ser realizados, verificando a toxicidade do etanol nessas espécies de leveduras.

#### **5.4.3 Comparação entre hidrólise ácida e enzimática**

Para comparar o processo de hidrólise ácida e enzimática dos ensaios fermentativos realizados com os três tipos de leveduras e com as três variedades de farinha, foram construídas as Tabelas 13, 14 e 15 com a eficiência do processo de fermentação ( $\eta_p(\%)$ ) e com dados de produtividade (PR), para as leveduras C3 (12), C1 (10) e o fermento comercial, respectivamente, de acordo com as Equações 15 e 16:

$$\eta_P = \frac{P}{0,511 \times S_o} \times 100 \quad (\text{Eq.15})$$

$$Pr = \frac{P}{t} \quad (\text{Eq.16})$$

Onde:

$P$  = Concentração de etanol (g/L);

$S_o$  = Concentração inicial de glicose;

$t$  = Tempo de fermentação.

**Tabela 13.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com a levedura C3 (12)

<b>Variedade – Hidrólise</b>	<b>Eficiência do processo (<math>\eta_p(\%)</math>)</b>	<b>Produtividade (g/L.h)</b>
Variedade ST-AC	74,10	1,25
Variedade ST-Enz	64,92	1,78
Variedade SE-AC	77,91	1,33
Variedade SE-Enz	91,10	1,90
Variedade IS-AC	71,66	1,25
Variedade IS-Enz	90,00	1,83

Pela Tabela 13 pode-se observar que a hidrólise enzimática tem eficiências superiores que a hidrólise ácida com exceção da Variedade-ST, isso provavelmente é devido ao fato do elevado teor de glicose gerado no hidrolisado inibindo o metabolismo do microrganismo. Esse fato também é observado nas Tabelas 14 e 15 para os outros dois tipos de microrganismos utilizados. As melhores eficiências e produtividade dos ensaios com a levedura C3 (12) foi com a variedade-SE, utilizando a hidrólise enzimática.

**Tabela 14.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com a levedura C1 (10)

<b>Variedade - Hidrólise</b>	<b>Eficiência do processo (<math>\eta_p(\%)</math>)</b>	<b>Produtividade (g/L.h)</b>
Variedade ST-AC	79,08	1,33
Variedade ST-Enz	66,74	1,83
Variedade SE-AC	74,99	1,28
Variedade SE-Enz	92,70	1,93
Variedade IS-AC	71,66	1,25
Variedade IS-Enz	91,64	1,86

Na Tabela 14, também foi observado a superioridade da eficiência de processo fermentativo da hidrólise enzimática para as variedades IS e SE. A Hidrólise enzimática converteu maiores quantidades de glicose, mantendo-se assim, uma boa relação entre concentração de glicose e produção de etanol. A variedade-SE também se mostrou a melhor nos dois parâmetros estudados. Já quando o fermento comercial foi utilizado, Tabela 15, observou-se um ligeiro aumento da eficiência na variedade-IS, porém a variedade-SE ainda obteve a maior produtividade.

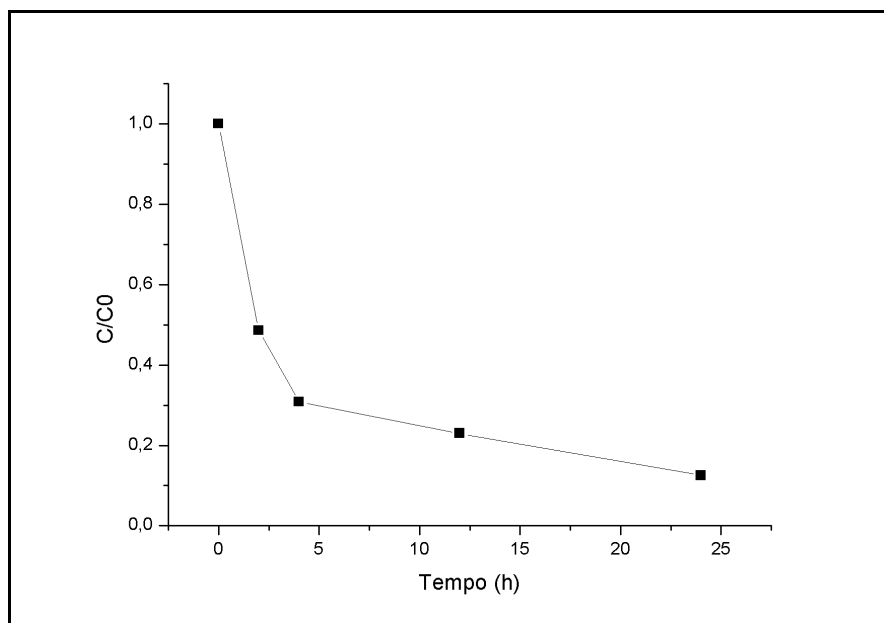
**Tabela 15.** Eficiência de processo e produtividade para os ensaios com o fermento comercial

<b>Variedade - Hidrólise</b>	<b>Eficiência do processo (<math>\eta_p(\%)</math>)</b>	<b>Produtividade (g/L.h)</b>
Variedade ST-AC	82,05	1,38
Variedade ST-Enz	63,71	1,75
Variedade SE-AC	78,88	1,35
Variedade SE-Enz	87,11	1,82
Variedade IS-AC	79,30	1,38
Variedade IS-Enz	87,55	1,78

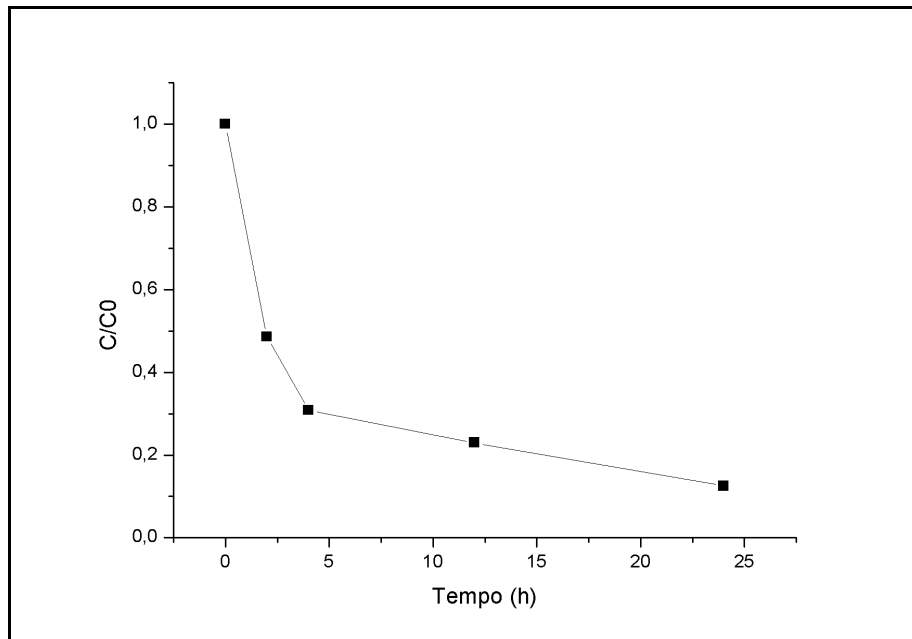


## 5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE CONSUMO DE GLICOSE

Para os ensaios de fermentação com maiores valores de teor alcoólico tanto para hidrólise ácida quanto para hidrólise enzimática foi realizado um estudo cinético de consumo de glicose na fermentação. Esses ensaios foram com a Variedade-IS com o fermento comercial para hidrólise ácida e com a Variedade-SE com a levedura C1(10) para hidrólise enzimática. Esses resultados estão mostrados nos Gráficos 32 e 33, respectivamente.



**Figura 36.** Consumo de glicose do Fermento Comercial durante a fermentação do hidrolisado ácido da farinha da Variedade-IS.



**Figura 37.** Consumo de glicose da levedura C1 (10) durante a fermentação do hidrolisado enzimático da farinha da Variedade-SE.

As Figuras 36 e 37 mostram perfis de consumo de glicose semelhantes para os dois tipos de levedura e os dois tipos de variedades de farinha, porém na hidrólise ácida, Figura 36, o consumo de glicose é mais rápido, pois a concentração inicial de glicose é mais baixa. No caso da hidrólise enzimática, como a concentração de glicose é mais elevada devido às melhores conversões do amido, deve ter ocorrido uma inibição do metabolismo inicial da levedura devido ao excesso de açúcar.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposta a comparação entre a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática de variedades de farinha de mandioca para produção de etanol, pelos resultados mostrados, pode-se concluir que:

- A hidrólise enzimática fornece conversões de amido em glicose com 70 a 90% de eficiência, enquanto que a hidrólise ácida fica apenas em torno de 58% de eficiência de conversão;
- As maiores conversões da hidrólise enzimática gera, conseqüentemente, maiores concentrações de açúcar que não deve ser usada sem diluição, pois leva a inibição do metabolismo da levedura. Foi o que aconteceu com a variedade-ST, que teve 92% de conversão de amido em glicose, porém apresentou menores eficiências de processo em relação as outras variedades e até em relação a hidrólise ácida;
- A melhor variedade de farinha de mandioca, ou seja, aquela que apresentou melhores eficiências de processo e maiores teores de etanol foi a variedade-SE, apesar da menor quantidade de amido sua eficiência de conversão foi adequada para realização da fermentação para os três tipos de leveduras estudadas;
- As leveduras do tipo C3(12) e C1 (10) foram melhores que o fermento comercial quando o teor alcoólico estava superior a 10 %, mostrando maior resistência a intoxicação pelo etanol.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar a composição geral do hidrolisado visando a complementação nutricional do mosto e, conseqüentemente, seu enriquecimento e melhores rendimentos de fermentação;
- Realizar um planejamento experimental visando estabelecer condições ótimas de hidrólise da farinha e de fermentação para cada levedura, definindo concentração inicial de açúcar, tempo de fermentação.
- Realizar diluições do meio para verificar o processo de inibição;
- Variar as condições de hidrólise;
- Analisar a influência da toxicidade do etanol nas espécies de leveduras;
- Realizar estudo de inibição pela quantidade de açúcar e quantidade de etanol;
- Fazer contagem de células após a fermentação;
- Realizar estudo cinético com uso de modelos da literatura.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A. K. DE SOUZA. *Estudo do Comportamento Cinético e da Estabilidade de uma Linhagem Recombinante de Saccharomyces cerevisiae no Processo de Fermentação Alcoólica de Amiláceos*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo- USP. São Paulo, 199
- ADAMS, C.; SIQUEIRA, A. D.; MURRIETA, R. S. & SANCHES, R. *O Pão da Terra: Da Invisibilidade da Mandioca na Amazônia*. In: ADAMS, CRISTINA; MURRIETA, RUI; NEVES, WALTER. **Sociedade Caboclas Amazônicas: Modernidade e Invisibilidade**. Annablume: São Paulo, 2006.
- ALBUQUERQUE, M. A mandioca na Amazônia. Belém, Pará, **Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia**. Ministério do Interior, 1969. 277p.
- ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L.C.G.; SALIM, J.; TELES, F.F.F.; QUIRINO, J.G. Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. *Revista Brasileira da Mandioca*, v. 12, n. 1, p. 7-12, jan. 1993.
- AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p.
- ANDRIETA, S. R. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial*. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1994. 178p.
- ANDRIETA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETA, M. G. S. Bioetanol-Brasil, 30 anos de vanguarda. **MultiCiência**, Universidade de Campinas, 2006.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotechnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda, v. 5., p. 1-43, 2001.
- ARAÚJO, N. Q. Hidrólise enzimática da mandioca. **Informativo do INT**, Rio de Janeiro, p. 42-45, 1975.
- ARAÚJO FILHO, A. A. **Obtenção de álcool anidro a partir de mandioca**. Fortaleza: BNB, ETENE, 1976. p. 86.
- ARAÚJO, N. Q. Tecnologia da fermentação alcoólica dos polissacarídeos. **Informativo do INT**, Rio de Janeiro, p. 15-25, 1981.
- ARCE, L. S. D. *Viabilidade econômica da tiquira produzida com enzimas comerciais*. 2005. 53p. Monografia de Conclusão do Curso de Agronomia, apresentada ao Centro de Tecnologias para o Agronegócio da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2005.
- BAIROCH, A., APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids. Res.* v.28, n.1, p.45-48, 2000b.
- BANKS, W., GREENWOOD, C.T., KHAN, K.M. The interaction of linear, amylose oligomers with iodine. **Carbohydrate Research**, v. 17, p. 25-32, 1971.
- BARGHINI, A. *O Milho na América do Sul Pré-Colombiana. Uma História Natural*. In: **Antropologia nº 61**. Rio Grande do Sul: Unisinos, 2004.
- BASSO, L. C. 1991. In: ALVES, D. M. G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, 1994. 199p.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. **I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol**. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.40, p.95-117, 1989.

BERGHOFER, E.; SARHADDAR, S. *Production of glucose and high fructose syrup by enzymatic direct hydrolysis of cassava roots*. **Process Biochemistry**, p. 188-194, Dec. 1988.

BIANCO, V. D.; ARAÚJO, N. Q.; MICELI, A.; SILVA, P. C. S.; BURLE, J. A. S. Álcool de mandioca por fermentação contínua. *Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia*, ano 9, nº 10, 21, 26, 1976.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química dos alimentos. 2ª. Ed. Varela, 1989, São Paulo.

BRASIL. Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, p. 20, 21 out. 1978.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. *Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melão de cana*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.31 n.2, Universidade Federal de Lavras março/abril, 2007.

BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

CAMARGO, C. E. D. Mandioca: “o pão caboclo”, de alimento a combustível. São Paulo:Ícone, 1985. 66p.

CASCUDO, L. C. História da Alimentação no Brasil. 3ª. ed. São Paulo: Global, 2004.

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

CEREDA, M. P., Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Vol. 1 – Propriedades gerais do amido, Fundação Cargill, 2001, São Paulo.

CEREDA, M. P., Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Vol. 2 – Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas, Fundação Cargill, 2001, São Paulo.

CEREDA, M. P., Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Vol. 3 – Tecnologia, uso e potencialidade de tuberosas amiláceas latino americanas, Fundação Cargill, 2001, São Paulo.

CEREDA, M. P., Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Vol. 4 – Manejo, uso e subprodutos de industrialização da mandioca, Fundação Cargill, 2001, São Paulo.

CONN, E.E. ; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

DEAN, W. A Ferro e Fogo: A História e a Devastação da Mata Atlântica Brasileira. Trad. São Paulo, Cia. Das Letras, 1996.

DENARDIN, C.C. *Influência do Teor de Amilose e Beneficiamento do Arroz na Resposta Biológica de Ratos*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, RS, 2008.

DZIEDZIC, S.Z.; KEARSLEY, M.W. **Glucose syrups**: science and technology. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1984. 276p.

EMPRESA DE PESQUISA BRASILEIRA AGROPECUÁRIA. Mandioca e fruticultura. <<http://www.cnpmf.embrapa.br>> Acesso em 15 out. 2010.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FERREIRA, G. B., MELO, V. V. de, ALMEIDA, J. B. O. de, EVANGELISTA, A. F. e SOUZA, R. R. de, Caracterização do Processo de Obtenção de Uma Aguardente de Mandioca, *Braz. J. Food Technol.*, 5º SIPAL, março, 2005.

FONSECA, F. L. M. Transformação da mandioca em álcool. *Faxjornal*, França, n. 29, p. 2, 1996.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F. Estrutura dos Grânulos de Amido de Milho Normal e Ceroso. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Vol. 17, nº 3. Campinas Sept./Dec. 1997.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Propriedades Gerais do Amido**. Série "Cultura de Tuberosas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, V.1, 2001. 224p.

GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B. K. *Comparative economics of the production of high fructose syrup from cassava chips and cassava starch*. **Starch/ Stärke**, v. 41, n. 2, p. 64-68, 1989.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

GONÇALVES, R. S.; PFEIFFER, J. R.; BATTISTIN, A.; FERMINO, M. H.; BUSNELLO, Â.C. Determinação do teor de glicose de diferentes acessos de mandioca a partir da hidrólise ácida das raízes. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 15, p. 69-71, 2009.

GONÇALVES, C. W. P. Os (Des) caminhos do Meio Ambiente. São Paulo: Ed. Contexto, 1998.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. **Microbial - Amylases: a Biotechnological Perspective**. *Process Biochemistry*. Jan. 2003. p.1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 15 Nov. 2010.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, p.56, 1982.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.** v.316, n.2, p.695-696, 1996.

HIZUKURI, S. 1996. Starch: Analytical Aspects. In: Eliasson, A. C., Editor, 1996. **Carbohydrates in Food**. Marcel Dekker, New York, pp. 347-429.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 45, p. 253-267, 2001.

HUANG, N., SUTLIFF, T.D., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol. Biol.* v.14, n.5, p.655-668, 1990.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 2002.

IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* v.124, n.6, p.587-590, 1999.

JACKSON, E. A. *Brazil's National Alcohol Programme. Process Biochemistry.* 29- 30, 1976.

JANEČEK, Š., MACGREGOR, E.A., SVENSSON, B. Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from  $\alpha$ -amylases. *Biochem. J.* v.305, n.2, p.685-686, 1995.

JANEČEK, Š.  $\alpha$ -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* v.67, n.1, p.67-97, 1997.

JARDINE, J. G.; DISPATCHO, I.; PERES, M. R. Indicações de Aspectos Tecnológicos Sobre o Bioetanol de Matéria-Prima amilácea. **Embrapa Informática Agropecuária.** Campinas, São Paulo, 2009.

KEARSLEY, M.W.; TABIRI, J. N. *The enzymic hydrolysis of starch containing crops. Lebensmittel- Wissenschaft & Technologie,* v. 12, n. 4, p. 199- 202, 1979.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAIDLER, K.J. **Introduction to the Chemistry of Enzymes.** New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1954. 208 p.

LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.

LEONEL, M., CEREDA, M.P. Melhoria do Rendimento de Hidrólise Enzimática para a produção de Etanol a partir de Farelo de Mandioca, **Brasilian Journal of Food Technology,** 2, 111-118, 1999.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In:LIMA, U.A. et al (Coord.). **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001. P. 11- 18. (Biotechnologia Industrial); v. 3.

LOBO, A. R.; LEMOS SILVA, G. M. Amido Resistente e Suas Propriedades Físico-Químicas. **Revista de Nutrição,** Campinas, 16(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.

MACHADO, C.M.M.; JOB, L.C.M.A. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista de Política Agrícola,** ano XV. n.3, p.64-78.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms.** 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

MARTINI,A. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 207-209, 2003.

MARTINI, A. Y VAUGHAN-MARTINI, A. Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology.* (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) p. 105-123, Springer- Verlag, Berlin, 1990.

MENDES, B. A. **Obtenção, caracterização e utilização de puba como matéria prima na produção de etanol.** 1992. 176 p. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1992.

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



MUA, J.P., JACKSON, D.S. Relationships between functional attributes and molecular structure of amylose and amylopectin fractions from corn starch. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p.3848-3854, 1997.

NATURAL COMUNICAÇÃO. *Mandioca brasileira*: sistema de informações agroindustriais da mandioca brasileira. Disponível em: <http://www.mandioca.agr.br>. Acesso em: Junho de 2010.

NAKAJIMA, S.; FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T. Xanthan gum production in a fermentor with twin impellers. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 6, p. 392-397, 1990.

OBERLING, D. F. *Avaliação Ambiental Estratégica da Expansão de Etanol no Brasil: Uma Proposta Metodológica e Sua Aplicação Preliminar*. 225p. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Ciência em Planejamento Energético. Rio de Janeiro, 2008.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.

OSTROWSKI, A. P., VARGAS F., PIZZINATO, L. E., ARAUJO, J. H. B.

PUJADAS, G., RAMIREZ, F.M., VALERO, R., PALAU, J. Evolution of  $\beta$ -amylase: Patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. *Proteins*, v.25, n.4, p.456-472, 1996.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; SOCCOL, C.R. ; NIGAM, P. **Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes**. In: Current Science, v. 77. n.1 Jul, 1999. p. 149-161.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PARK, Y. K.; BÄR, W. H.; PAPINI, R. S. Relação entre intumescimento, gelatinização e suscetibilidade dos amidos de mandioca e de milho à alfa-amilase bacteriana. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 95-99, 1971.

PELCZAR. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. Cap. 10. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998. p. 258-271.

PINTO E SILVA, P. Farinha, feijão e carne-seca: um tripé culinário o Brasil. São Paulo: Editora Senac, 2005.

PLUMBLEY, R. A.; RICKARD, J.E. Post –harvest deterioration of cassava. **Tropical Science**, v. 31, p. 295- 303, 1991.

PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann. Rev. Plant Physiol.* v.33, p.431-454, 1982.

PRETORIUS, I. S.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 61-74, 1999.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRETORIUS, I. S. Gene technology in winemaking: new approaches to an ancient art. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 66, n. 1, p. 27-47, 2001.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technol. Biotechnol.** v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003

PUJADAS, G., PALAU, J. Evolution of  $\alpha$ -amylases: Architectural features and key residues in the stabilization of the ( $\beta/\alpha$ )(8) scaffold. *Mol. Biol. Evol.* v.18, n.1, p.38-54, 2001.

- QUAGLIA, G. **Ciência y Tecnología de la Panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 485 p.
- QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvested in the region of Alicante (Spain). **Journal Food Science**, v. 55, p. 1603-1606, 1990.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2948-2953, 1992.
- QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3-10, 2003 (a).
- QUEROL, A.; BELLOCH, C. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 201-205, 2003 (b).
- RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.18, p.583-589, 1967.
- REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.
- ROSAS, J. Curso de Biología Molecular Y Celular. **Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos**, 2003. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>> Acesso em 20 Out. 2010.
- ROSENTHAL, F.R.T. A cultura da mandioca. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 27-36, jan., 1976.
- SALLA, D. A.; CABELLO, C. *Balanços de Massa do Etanol, Água, CO<sub>2</sub> e Efluentes no Processamento Industrial da Mandioca para Produção de Etanol*. Tese de Doutorado em Agronomia Apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Área de Concentração: Energia na Agricultura. 185p. Botucatu, 2008.
- SANTANA, N. B. *Eficiência da Hidrólise de Amido de Mandioca por Diferentes Fontes de Enzimas e Rendimento da Fermentação Alcoólica para Produção de Etanol*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MKAMI, B. *Comparison of Abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on Raw Starch Granules*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 711-715, 2000.
- SAUER, J. D. *Historical Geography of Crop Plants: a select roster*. **CRC Press**: Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993.
- SAWADA, I. M. N. *Contribuição ao Estudo da Obtenção de Etanol a Partir de Mandioca por Fermentação Contínua*. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, 1979, 138p.
- SHANNON, J. C.; GARWOOD, D. L. Genetics and Physiology of Starch Development. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Editores). **Starch: Chemistry and Technology**. Segunda Edição. London: Academic Press, 1984. cap. 3, p. 26-79.
- SILVA, H. A. DA. *Mandioca, a rainha do Brasil? Ascensão e queda da *Manihot esculenta* em São Paulo*. 168p. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em História Social da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.
- SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel- ethanol fermentation process assessed by PCR- fingerprinting, p. 13-23, 2005.

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p. 221-230.

SPIER, M.R. ; WOICIECHOWSKI, A. L. ; SOCCOL, C. R. Produção de  $\alpha$ -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. **VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1. p. 116-116.

SPIER, M. R. *Produção de enzimas amilolíticas fúngicas \_amilase e amiloglicosidase por fermentação em estado sólido*, 2005. 157 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2005.

STARK, W. H. Alcoholic fermentation of grain. **Industrial Fermentations**. V.1, p. 17-71. Chemical Publishing Co., Inc:New York, 1954.

STECKELBERG, C. *Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas*, 2001. 215p. Tese de doutorado apresentada à Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 446.

STUPIELLO, J. P. *Matérias-Primas para Obtenção do Alcool. Fermentações Industriais, Biodegradação e Transformações Microbianas no Solo*. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 66- 69, 1978.

SUBBARAO, K.V., DATTA, R., SHARMA, R. Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.657-666, 1998.

SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.77, p.164-177, 1971.

SURMELY, R. ; ALVAREZ, H. ; CEREDA, M.P. ; VILPOUX, O.F. Hidrólise do Amido. In: *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. v. 3. Cap. 15. 2003. p. 377-395.

SUTLIFF, T.D., HUANG, N., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an  $\alpha$ - amylase multigene cluster in rice. **Plant Mol. Biol.** v.16, n.4, p.579-591, 1991.

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

SZAKACS, G. **Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation**. In: **Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries**, Clermont-Ferrand, France. 2004. v. 1. p. 20.

TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amyloclastic Enzyme to the Fermentation Industry. **J. Ind. Eng. Chem**, 1914, 6, p. 824-828.

TAPARELLI, J. R. *Modificação Química do Amido de Mandioca e Estudo de sua Aplicação em Revestimento de Couché*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais. Campinas, São Paulo, 2005.

TEERAPATR S, CHOLLADA S, BONGOTRAT P, WICHIE K, SIRINTIP C. Utilization of waste from cassava starch plant for ethanol production. **Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment (SEE)"**, Hua Hin, Thailand, 2004.

TEIXEIRA, C.; ANDREASEN, A. A.; KOLACHOV, P. Ethyl alcohol from cassava. **Industrial and Engineering Chemistry**, p.1781-1783, 1960.

TERNES, M. *Fisiologia da planta*. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540p. (Série: culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, 2).

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 6 ed. Califórnia: Art Méd, 2002.

TRINDADE, S. C. *Fuel ethanol issues in Thailand: ethanol production, stillage disposal and market penetration*. New York: UN/DTCD, 1985. (draft).

TROVATI, J.; GALVÃO, C. M. e GIORDANO, R. L. C. Produção Contínua de Etanol a partir de Amido, utilizando Amiloglicosidase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em geral de Pectina. **Anais do XIV COBEQ (CD)**, Natal, 2002.

TUNGA, R.; TUNGA, B.S. **Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation**. **International Center for Biotechnology**. Japan: Osaka University, 2003. 12p.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA) Estatística da produção nacional de álcool. Disponível em <[www.portalunica.com.br](http://www.portalunica.com.br)>. Acesso em 17 ago. 2010.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 16, p. 113-119, 1993.

VIEIRA-JUNIOR, A. *Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma  $\alpha$ -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)*. São Paulo, 2001. 87p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

VIEIRA-JUNIOR, A., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M. Molecular cloning and characterization of an  $\alpha$ -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. **J. Agric. Food Chem.** 2006. *Submitted*.

VILLEN, R. A. Mauá: Biotecnologia- Histórico e Tendências. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.

WALT, J. P. Vander.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGER-VAN RIJ, N. S. W. (Ed). **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104, 1984.

WARD, O. **Biotecnologia de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p. 64-67 e 233-247.

WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, Washington, v.5, p.317-353, 1963.

WHISTLER, R. L., BeMILLER, J. N. **Carbohydrate chemistry for foods scientists**. Saint Paul: Eagan Press, 1999. 241p.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Carbohidratos. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. P. 81- 156.

YANG, V.; SCIGLIANO, A. Etanol e eteno a partir de matéria primas renováveis. **Revista Brasileira de Indústria Química**, 1977.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84-86, p. 1147- 1161, 2000.

ZIEGLER, P. Cereal beta-amylases. **J. Cereal Sci.** v.29, p.195-2004, 1999.

ZOBEL, H.F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch**, v.40, p.44-50, 1988.