



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**FERMENTAÇÃO ETANÓLICA CONJUNTA DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*
(L.) Lam), MANDIOCA (*Manihot esculenta*) E MILHO (*Zea mays*).**

Fernanda Aparecida Lima Silva Alvim

Orientador: Tarso da Costa Alvim

Co-Orientador: Sérgio Donizete Ascêncio

**PALMAS – TO
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**FERMENTAÇÃO ETANÓLICA CONJUNTA DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*
(L.) Lam), MANDIOCA (*Manihot esculenta*) E MILHO (*Zea mays*).**

Fernanda Aparecida Lima Silva

Orientador: Tarso da Costa Alvim

Co-Orientador: Sergio Donizete Ascêncio

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Tocantins como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Agroenergia.**

**PALMAS – TO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Palmas

S586a Silva, Fernanda Aparecida Lima
Fermentação etanólica conjunta da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), Mandioca (*Manihot esculenta*) e Milho (*Zea mays*) / Fernanda Aparecida Lima Silva. _ Palmas, 2013.
117f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins,
Mestrado em Agroenergia.

Linha de pesquisa: Processos de obtenção de biocombustíveis
e avaliação de aproveitamento de seus resíduos. 2013.

Orientador: Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim

Co-Orientador: Sergio Donizete Ascêncio

1. Hidrólise Enzimática. 2. Amilácea. 3. Superfície de Resposta.
I. Alvim, Tarso da Costa. II. Universidade Federal do Tocantins. III.
Título.

CDD 333.72

Bibliotecária: Emanuele Santos
CRB-2 / 1309

Todos os Direitos Reservados – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do código penal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

FERMENTAÇÃO ETANÓLICA CONJUNTA DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*
(L.) Lam), MANDIOCA (*Manihot esculenta*) E MILHO (*Zea mays*)

ALUNO: Fernanda Aparecida Lima Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Tarso da Costa Alvim (Presidente)

Dr.ª Solange Cristina Carreiro (Examinador Interno - UFT)

Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga (Examinador Interno - UFT)

Dr Raphael Sanzio Pimenta (Examinador Externo - UFT)

Data da Defesa: 12/04/2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da
Dissertação foram contempladas

Dr. Tarso da Costa Alvim (Presidente)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Dedico esta conquista aos meus dois grandes inspiradores para o estudo, que sempre estimularam a vontade para buscar o conhecimento: minha mãe, Marizete Soares de Lima Silva, e meu pai, Francisco Amaro da Silva, e também ao meu querido esposo Jonas Chaves Alvim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido executar o que me era pedido e por ter colocado as pessoas certas na minha vida durante esta jornada. Agradeço muito a todos os meus familiares e amigos. Um agradecimento especial a minha mãe, Marizete Soares de Lima Silva e ao meu pai, Francisco Amaro da Silva, por terem feito todos os sacrifícios para que eu chegasse até aqui. Aos meus irmãos, Rodrigo e Fabrício, e a minha irmã, Flavia; pelo carinho e palavras de incentivo.

Ao meu querido esposo Jonas por sempre me dar suporte para continuar, seja durante a realização deste experimento, pelas noites passadas na UFT e pela força, tanto física quanto emocional. Enfim, por toda a sua paciência, amor e consideração.

Ao Professor Tarso pela orientação e ensinamentos.

A todos os professores do mestrado que me transmitiram conhecimentos.

Aos meus colegas do mestrado pela convivência agradável e debates construtivos, principalmente a Silvia Gomes pela amizade construída.

Aos laboratórios que permitiram o desenvolvimento deste trabalho: Labic, Lasper, Lafrutec, Complexo de Laboratórios da Medicina.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a finalizar esta etapa.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | xiii |
| LISTA DE TABELAS..... | xv |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES..... | xvii |
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 3.1. Fontes Atuais de Energia..... | 22 |
| 3.2. Matérias-primas amiláceas para produção de etanol..... | 24 |
| 3.2.1. Batata-doce | 24 |
| 3.2.2. Mandioca..... | 28 |
| 3.2.3. Milho | 34 |
| 3.3. Aplicação da hidrólise enzimática em amiláceas..... | 39 |
| 3.3.1. Fatores do processo que alteram a Hidrólise Enzimática..... | 44 |
| 3.3.2. Métodos aplicados para análise..... | 46 |
| 3.4. Fermentação alcoólica..... | 47 |
| 3.5. Normatização do Etanol Combustível..... | 49 |
| 3.6. Metodologia de superfície de resposta..... | 55 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 56 |
| 4.1. Matérias-primas | 56 |
| 4.1.1. Milho | 56 |
| 4.1.2. Batata-doce | 56 |
| 4.1.3. Mandioca..... | 56 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2. | Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 57 |
| 4.2.1. | Quantificação dos açúcares e do etanol por CLAE | 57 |
| 4.3. | Análises de composição..... | 58 |
| 4.3.1. | Açúcares solúveis..... | 58 |
| 4.3.2. | Glicose Total e Amido..... | 58 |
| 4.4. | Primeiro ensaio: Efeito das concentrações das enzimas α -amilase e glicoamilase sobre a hidrólise da mistura amilácea..... | 59 |
| 4.4.1. | Delineamento experimental | 59 |
| 4.4.2. | Processo de Hidrólise | 61 |
| 4.4.3. | Análises dos açúcares redutores e do perfil sacarídeo dos hidrolisados..... | 62 |
| 4.4.4. | Análise dos dados | 62 |
| 4.4.5. | Validação do modelo..... | 63 |
| 4.5. | Segundo ensaio: Efeito do tempo de fermentação e da concentração da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 63 |
| 4.5.1. | Delineamento experimental | 63 |
| 4.5.2. | Preparo do mosto..... | 64 |
| 4.5.3. | Análises dos fermentados | 65 |
| 4.5.4. | Análise dos dados | 65 |
| 4.5.5. | Validação do modelo..... | 65 |
| 4.6. | Terceiro ensaio | 66 |
| 4.6.1. | Preparo do hidrolisado e Fermentação..... | 66 |
| 4.6.2. | Análises dos fermentados..... | 67 |
| 4.6.3. | Análise dos Dados..... | 68 |
| 4.6.4. | Cálculo da Eficiência do processo fermentativo..... | 68 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 5.1.1. | Açúcares solúveis..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. Primeiro ensaio | 72 |
| 5.2.1. Validação do modelo..... | 78 |
| 5.3. Segundo ensaio..... | 79 |
| 5.3.1. Validação de método | 83 |
| 5.4. Terceiro ensaio | 86 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 92 |
| 7. REFERÊNCIAS | 93 |
| ANEXOS..... | 114 |
| ANEXO A - Cromatogramas dos açúcares solúveis das matérias-primas | 115 |
| ANEXO B- Cromatogramas utilizado na Metodologia de determinação do Amido | 116 |
| ANEXO C- Cromatogramas das diferentes combinações das matérias-primas utilizadas no Ensaio 3 | 117 |

RESUMO

Como continuamente se vê aumentada a demanda por energia, principalmente em face do rápido crescimento da população e do desenvolvimento industrial, faz-se necessário incrementar fontes de energia alternativas. Com esse intuito, desenvolveu-se um processo de produção de etanol utilizando conjuntamente, e em várias combinações, a batata-doce, o milho e a mandioca, otimizando-se esse processo em três ensaios. O primeiro ensaio foi realizado para se avaliar o efeito das concentrações das enzimas α -amilase (Liquozyme® SC) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel), no processo de hidrólise do amido sobre o teor de glicose. O segundo ensaio avaliou o efeito do tempo de fermentação e da concentração da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, sobre o teor de etanol. Na última etapa explorou-se a fermentação das três matérias-primas (batata-doce industrial, mandioca e milho) em diferentes combinações, utilizando-se as melhores condições encontradas nos 1° e 2° ensaios. As matérias-primas batata-doce, mandioca e milho apresentaram teores médios de umidade iguais a 66,77%, 66,52% e 13,77%, respectivamente. O teor de açúcares solúveis foi de 3,41% na Batata-doce industrial (BDI), 1,73% na Mandioca (Ma) e de 1,65% no Milho (Mi). Quanto ao teor de amido, a matéria-prima *in natura* apresentou 22,11% e 20,22% para a batata-doce industrial e mandioca, respectivamente. Os grãos de milho, triturados, possuíam 41,72%. Os resultados dos ensaios mostraram que a faixa ótima para máximo rendimento de açúcares redutores ocorreu quando 0,36 ml (0,45 g/Kg_{amido}) de α -amilase (Liquizyme® SC) e 10,18 ml (11,71 g/Kg_{amido}) de glicoamilase (Spirizyme® Fuel) foram utilizados por kg de amido (base seca), e que a condição otimizada para fermentação da mistura (BDI, Ma e Mi) foi de 2,25 % de levedura e 24 horas de fermentação, sob a qual obteve-se o maior rendimento de etanol. Quando se compararam as diferentes combinações das matérias-primas, verificou-se que a mistura das amiláceas (BDI, Ma e Mi), com teor de amido proporcional, produziu o maior volume de etanol, com valor médio igual a 13301,62 L/ha.

ABSTRACT

How continually see increased demand for energy, especially in the face of rapid population growth and industrial development, it is necessary to increase alternative energy sources. To that end, it has developed a process for producing ethanol using at the same time and in various combinations, sweet potatoe, corn and cassava, optimizing this process is in three trials. The first trial was conducted to evaluate the effect of the concentrations of the enzymes α -amylase (Liquozyme ® SC) and glucoamylase (Spirizyme Fuel ®) in the process of hydrolysis of starch on glucose level. The second trial evaluated the effect of fermentation time and the concentration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the concentration of ethanol. In the last step was explored the fermentation of the three raw materials (industrial sweet potato, cassava and maize) in different combinations, using the best conditions found in the 1st and 2nd tests. The raw sweet potato, cassava and corn had average moisture equal to 66.77%, 66.52% and 13.77%, respectively. The soluble sugar content was 3.41% in sweet potato industry (BDI), 1.73% in cassava (Ma) and 1.65% in corn (Mi). As the starch content, the raw material in nature showed 22.11% and 20.22% for industrial sweet potato and cassava, respectively. Corn kernels, crushed, possessed 41.72%. The test results showed that the optimum range for maximum yield of reducing sugars occurred when 0.36 ml (0.45 g/Kg_{starch}) of α -amylase (Liquizyme ® SC) and 10.18 ml (11.71 g/Kg_{starch}) of glucoamylase (Spirizyme Fuel ®) were used per kg of starch (dry basis), and that the optimal condition for fermentation of the mixture (BDI Ma and Mi) was 2.25% yeast and 24 hours of fermentation, in which gave the highest yield of ethanol. When comparing different combinations of raw materials, it was found that the mixture of starch (BDI Ma and Mi), with proportional starch produced the largest amount of ethanol, with an average value of 13,301.62 L/h.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fluxograma de obtenção de etanol utilizando diferentes combinações das matérias-primas, em função da quantidade de amido. Cada batelada foi realizada em triplicata.....66
- Figura 2:** Gráfico de Pareto observado na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....73
- Figura 3:** (a) Superfície de Resposta (b) Curvas de níveis. Observadas na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (Liquozyme® SC, 90°C/1,5h) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel, 60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....75
- Figura 4:** Cromatograma, obtido por CLAE, na corrida 3 do Ensaio 1 utilizando a condição de 2,1 ml de α -amilase/Kg de amido e 7,39 ml de glicoamilase/Kg de amido (Itens 4.3.5 e 5.3.1), para a hidrólise da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....78
- Figura 5:** Cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 1 utilizando a condição otimizada de 0,36 ml de α -amilase/Kg de amido e 10,18 ml de glicoamilase/Kg de amido (Itens 4.3.5 e 5.3.1), para a hidrólise da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....79
- Figura 6:** Gráfico de Pareto, mostrando o efeito das variáveis do modelo, obtido pela avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....81
- Figura 7:** Superfície de Resposta do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....82

Figura 8: Curvas de níveis do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....83

Figura 9: Cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 2 utilizando a condição otimizada de 2,25 % de levedura, sob 24 horas de fermentação (Itens 4.4.5 e 5.4.1), para a fermentação da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....86

Figura A.1: Cromatograma, obtido por CLAE, das amostras das extrações com etanol 80% (Item 4.2.2) da batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....115

Figura B.1: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das amostras usadas na quantificação dos teores dos açúcares totais, pelo método da hidrólise enzimática (Item 4.2.3) da batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....116

Figura C.1: Cromatogramas, obtidos por CLAE, na avaliação das fermentações em diferentes combinações das matérias-primas (Item 4.5.1). Mostrando o melhor rendimento de etanol em L/ha (mistura de batata-doce, mandioca e milho) e o melhor rendimento em L/Kg de matéria-prima (milho). Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.....117

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Especificações do álcool etílico anidro combustível (EAC) e do álcool etílico hidratado combustível (EHC), utilizados no Brasil (ANP, 2011a); do Etanol desnaturado para mistura com gasolina e etanol Combustível (E85), utilizados nos EUA (EPA, 2010b).....51
- Tabela 2:** Especificações do etanol combustível e do E85 utilizadas nos EUA. (EPA, 2010b).....53
- Tabela 3:** Especificações do corante a ser adicionado ao etanol anidro combustível brasileiro, contidas no Regulamento Técnico ANP nº 3/2011 (ANP, 2011a)54
- Tabela 4:** Parâmetros utilizados para cálculos das curvas analíticas, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizadas na avaliação dos hidrolisados ou dos fermentados obtidos nos Ensaios 1, 2 e 3.....58
- Tabela 5:** Parâmetros variáveis do processo utilizados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre o rendimento de açúcares redutores na hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....60
- Tabela 6:** Delineamento experimental utilizado na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre o rendimento de açúcares redutores na hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....61
- Tabela 7:** Parâmetros utilizados nos cálculos da concentração de açúcares redutores (AR), nos hidrolisados da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho), na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1), utilizando a curva analítica, obtida pelo método de DNS (Miller, 1959).....62
- Tabela 8:** Parâmetros variáveis utilizados na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....64
- Tabela 9:** Delineamento experimental utilizado na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a

32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....64

Tabela 10: Delineamento experimental utilizado na avaliação da fermentação da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho) em diferentes combinações, utilizando as melhores condições determinadas nas etapas de hidrólise (Ensaio 1) e de fermentação (Ensaio 2).....67

Tabela 11: Valores médios da composição centesimal das matérias-primas utilizadas. Valores expressos em base seca.....70

Tabela 12: Valores médios da glicose total e do amido nas matérias-primas utilizadas. Valores expressos em base seca (b.s.) e úmida (b.u).....71

Tabela 13: Rendimento dos açúcares redutores (AR) observados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....72

Tabela 14: Coeficientes de regressão do rendimento dos açúcares redutores (AR), observados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho), e obtidos através da metodologia superfície de resposta.....73

Tabela 15: Rendimento de etanol observado na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....80

Tabela 16: Coeficientes de regressão para rendimento de etanol, observados na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho).....80

Tabela 17: Valores médios do rendimento em etanol obtidos no Ensaio 3, em diferentes combinações das matérias-primas.....87

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AML: complexo amilose-lipídios

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM: American Society for Testing and Materials

BDI: Batata-doce industrial

BTU: British Thermal Unit (Unidade térmica Britânica)

CE: Cassava ethanol (etanol de mandioca)

CG: Gasolina comum

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

DDGS: Dried Distillers Grains with Solubles (co-produto do processo de produção de etanol a partir do milho)

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DQO: Demanda Química de Oxigênio

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

E85: Etanol misturado com pelo menos 15% de hidrocarboneto

EC 3.2.1: glicosidases, enzimas que hidrolisam O- e S- compostos glicosídicos

EC: Enzyme Commission- classificação para enzimas pela natureza da ligação hidrolisada, pela natureza do substrato, e por último, a enzima

GEE: Gases de efeito estufa

Ma: Mandioca

Mi: Milho

MTBE: éter metil-terc-butil

NEV: Energia Líquida

NREV: Valor líquido de energia renovável

PMQC: Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis

t: Toneladas

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografia de camada delgada)

USDA: United States Department of Agriculture

X₁: Concentração de α-amilase (Liquozyme® SC)

X₂: Concentração de glicoamilase (Spirizyme® Fuel)

X₃: tempo de fermentação (h)

X₄ : Concentração de levedura (%p/p)

1. INTRODUÇÃO

Como a demanda de energia aumenta continuamente, devido ao rápido desenvolvimento da população e industrialização, o desenvolvimento de fontes de energia não está acompanhando a escalada do consumo. A demanda maior, de energia, é compensada com fontes convencionais de energia, como carvão, petróleo e gás natural. Além do impacto negativo dos combustíveis fósseis no aquecimento global, do preço volátil e da política instável em países exportadores, também resultou em um aumento significativo no interesse internacional em combustíveis alternativos e levou, em todo o mundo, ao estabelecimento de metas ambiciosas para substituição dos combustíveis convencionais por fontes alternativas (GALBE; ZACCHI, 2002; WYMAN, 2007).

Tais recursos energéticos alternativos precisam ser baratos, renováveis e causar pouca poluição. Assim, a atenção está sendo dada às fontes como a solar, eólica, térmica, hidrelétrica, biomassa, etc. A quantidade de biomassa que uma planta produz depende principalmente da quantidade de energia solar que recebe e do montante que pode armazenar na forma de carboidratos. As plantas usam 0,1% da radiação solar para o processo de fotossíntese (MCKENDRY, 2002). Entre todas as fontes renováveis de energia, a biomassa efetivamente armazena energia solar, podendo ser convertida em combustíveis sólidos, líquidos e gasosos, através de diferentes processos de conversão (OZBAY et al., 2001).

Os biocombustíveis são derivados direta ou indiretamente da fotossíntese. Devido às suas características renováveis, os biocombustíveis vão desempenhar um papel importante na mitigação da dependência dos combustíveis fósseis e reduzir as emissões de dióxido de carbono. O Bioetanol produzido a partir de açúcar e de amido por fermentação consiste em um promissor biocombustível, especialmente porque mostra potencial para substituir parcialmente a gasolina (MOJOVIC et al., 2006). Assim, a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis de primeira geração pode ser capaz de mitigar os problemas do aquecimento global e poluição ambiental (MABEE, 2006).

O economista Fernando Safatle (GÁS BRASIL, 2011) defende que a desconcentração da produção brasileira de álcool resultaria numa elevação substancial da oferta, o que reduziria o preço ao consumidor final e daria sustentabilidade ao mercado interno e internacional. A medida deve estar aliada à autorização da venda direta do produtor aos postos de combustíveis. As pequenas e médias usinas funcionariam como um sistema complementar ao agronegócio. Aponta também que o modelo das microdestilarias teria como principais beneficiários na produção a agricultura familiar e os assentamentos.

Segundo Lopes (1987), quimicamente, o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quanto às matérias-primas cana-de-açúcar, cereais, mandioca e batata-doce. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool; como aldeídos, ácidos orgânicos, alcoóis superiores; que são características de cada matéria-prima e do grau de purificação. Erdei et al., (2010) demonstraram a viabilidade da obtenção de etanol a partir de misturas de fontes de carbono diferentes, uma fonte amilácea e outra lignocelulósica. Portanto a partir de misturas de fontes amiláceas também se apresenta viável em termos de compatibilidade de hidrólise do amido e de rendimento de etanol.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Desenvolver o processo de produção de etanol utilizando conjuntamente, e em várias combinações, a batata-doce industrial, o milho e a mandioca, definindo-se matematicamente os parâmetros ótimos dessa fermentação.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar a melhor concentração das enzimas α -amilase (Liquozyme® SC) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel), a fim de se obter o máximo teor de glicose;
- Avaliar os efeitos do tempo de fermentação e da concentração de levedura (*Sacharomyces cerevisiae*), sobre os teores de etanol e de açúcares residuais, indicando-se os valores ótimos;
- Avaliar a eficiência da fermentação das três matérias-primas (Batata-doce industrial, mandioca e milho) em diferentes combinações, pela análise do rendimento em cada tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fontes Atuais de Energia

Dados referentes a 2011 evidenciam que do total de reservas de petróleo a maior quantidade (48,1%) está localizada nos países do Oriente Médio. Estes países produzem 32,6% do total mundial dos combustíveis fósseis e em contradição apresentam um consumo de apenas 9,1%. A América do Norte possui 13,2% das reservas, sendo que os Estados Unidos possuem apenas 1,9%, enquanto produz 8,8% e consome 20,5%. O Brasil apresenta uma reserva provada de 0,9% e contribui com 2,9% da produção mundial, consumindo 3% do total. Quanto à produção de biocombustíveis, os EUA contribuem com 48%, mais do que o dobro do Brasil (22,4%), entretanto suas emissões de CO₂ são 12 vezes maiores (17,7% e 1,4%, EUA e Brasil, respectivamente). O consumo mundial de energia primária cresceu 2,5% em 2011, praticamente em linha com a média de 10 anos. O combustível fóssil continua liderando o mundo, em 33,1% do consumo global de energia, mas o petróleo continua perdendo mercado, pelo décimo segundo ano consecutivo, a sua quota atual de mercado é a mais baixa desde 1965 (BP, 2012).

Entretanto, a participação de fontes renováveis na Matriz Energética Brasileira (44,1%) manteve-se entre as mais elevadas do mundo, com pequena redução (1%) devido à menor oferta de etanol. A biomassa de cana contribui com 15,7% da energia renovável e o petróleo e seus derivados com 38,6% da não renovável. Neste ano (2011), houve uma queda no consumo de biomassa da cana (9,2%), que foi compensada pelo aumento no consumo de gasolina e energia hidráulica

(eletricidade). Quanto ao consumo final de energia, por fonte, o bagaço de cana contribuiu com 11,9%, a gasolina com 9,1% e o etanol com 4,7%. Para transportes, o consumo de gasolina e de etanol anidro aumentaram (18,8 e 18,9%, respectivamente), devido à redução da oferta de etanol hidratado, que apresentou queda no consumo de 24,4% (BRASIL, 2012).

A nível global o Brasil foi o maior produtor (e consumidor) durante 25 anos, de biocombustível e só recentemente foi superado pelos Estados Unidos, gerando cerca de 26 milhões de m³ (RFA,2011) e consumo de 20,65 milhões de m³ na safra de 2010/11 (MME, 2011) a partir da cana. O programa de etanol brasileiro começou em 1975, para reduzir a dependência do país do petróleo importado e também para ajudar a estabilizar os preços do açúcar (MACEDO, 1995). Os EUA, com uma capacidade de cerca de 50 milhões de m³ em 2010 (RFA, 2011), produzem etanol a partir do milho. A China produz cerca de 1 bilhão de litros a partir de trigo e milho, enquanto a França, produz mais de 200 milhões de galões de etanol a partir da beterraba e do trigo.

A cana é facilmente competitiva com o petróleo a U\$70/barril, e gera pouco impacto interno nos preços dos alimentos. Além disso, as políticas brasileiras têm ajudado a estabilizar o setor sucroalcooleiro, fornecendo outro mercado para os produtores (HIRA, 2011). A consolidação do etanol combustível no Brasil foi possível devido à implantação de uma política pública abrangente, capaz de coordenar questões como organizar o desenvolvimento de cadeias de produção de matérias-primas, com o zoneamento agrícola e melhoramento de culturas, entre outras. Também estabilizou a cadeia de produção, estabelecendo a fase industrial, com a melhoria da eficiência do processo, utilização de subprodutos, financiamento de usinas e escoamento de etanol. Além da consolidação do segmento de consumo de biocombustíveis através de incentivos regulatórios e fiscais que permitiram a adaptação gradual de artefatos e equipamentos (RICO et al., 2010).

Uma comparação realizada entre os quatro estudos recentes sobre o balanço de energia para o etanol de cana-de-açúcar, mostrando que se, por um lado, um estudo mostra algum ceticismo sobre os benefícios dos combustíveis derivados de

culturas energéticas, por outro pesquisadores demonstram o grande potencial da experiência brasileira, pois possui um balanço energético positivo de 8,24 a 8,80, ou ainda melhor, quando introduzida uma tecnologia de produção mais limpa, evitando a poluição do ar e reforçando o papel do bagaço de cana (razão de 8,99) (TRIANA, 2011). O consumo de energia de fontes fósseis para a cana-de-açúcar é de 236 MJ/t na agricultura e indústria (contra 271 MJ/t, em 1985) e corresponde a 17,2 kg de CO₂/t de cana. As economias líquidas de CO₂ (equivalente), com a substituição da gasolina pelo etanol e do óleo combustível pelo bagaço excedente, foram 46,7 x10⁶ t de CO₂ (equivalente). Isto corresponde a quase 20% de todas as emissões de CO₂ dos combustíveis fósseis no Brasil (MACEDO, 1998).

Visando incentivar o desenvolvimento e aprimoramento de ações de mitigação das emissões de CO₂, o Brasil possui um Plano Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC), no qual pretende ampliar em 11%, ao ano, nos próximos dez anos o consumo interno de etanol e aumentar a oferta de energia elétrica de co-geração (principalmente a bagaço de cana-de-açúcar) para 11,4% da oferta total de eletricidade no país, em 2030 (BRASIL, 2008).

Neste sentido, novas alternativas de matéria-prima para produção de etanol podem auxiliar no cumprimento destas metas.

2.2. Matérias-primas amiláceas para produção de etanol

Dentre as várias matérias-primas amiláceas, que podem ser utilizadas na obtenção do etanol, pode-se citar a batata-doce, a mandioca e o milho.

2.2.1. Batata-doce

Esta raiz tuberosa é cultivada em todo o Brasil, principalmente nas regiões Sul e Nordeste, em termos de participação regional. Segundo o IBGE (2013) a produção nacional foi de quase 545 mil toneladas em 2011. A região Sul contribuiu com quase 236 mil t, sendo que só o estado do Rio Grande do Sul produz quase 30% da média nacional. A China é a maior produtora de batata-doce do mundo, com uma produção

que ultrapassa 75 milhões t (que representa cerca de 80% da produção mundial) em 2011, enquanto o Brasil ocupa a 18ª posição (FAO, 2013).

Observando a produção nos últimos dez anos (1991-2011) pode-se verificar que o cultivo de batata-doce encontra-se em declínio. Em 1991, na China, a produção foi de 105 milhões de toneladas, enquanto em 2011 registrou uma produção 28% menor, com um pico de 126 milhões t em 1999. O mesmo comportamento verifica-se para o Brasil com 622 mil toneladas em 1991 e uma redução de 12% em 2011. O pico na produção brasileira foi em 1994 com 655 mil t (FAO, 2013).

A batata-doce é uma cultura promissora para a produção de energia. Já em 1982, pesquisadores (MATSUOKA et al., 1982) relataram fermentação do álcool de batata-doce em um processo de etapa única. Jones et al. (1983) estabeleceram uma estimativa de 2160,3 a 4320,6 L de etanol por hectare, para duas cultivares de batata doce. Chua et al. (1984) não utilizaram o aquecimento, ou utilizaram temperatura abaixo do ponto de gelatinização, para converter o amido desta cultura em glicose. Wu e Bagby (1987) relataram efeitos de pectinases comerciais sobre a viscosidade de suspensões de batata-doce antes da fermentação e sobre a concentração máxima de etanol e observaram teores de matéria-seca com valores normais (18-24%), relativamente altos (27-30%), e muito altos (35%, ou maior). Araújo et al. (1978), no Instituto de Açúcar e Alcool (I.A.A.), obtiveram resultados de até 158 litros por tonelada de raiz, porém com baixo rendimento agrícola (11 a 13 t/ha). Yu et al. (1996) usando células de levedura imobilizadas do mosto de batata-doce concluíram que a atividade de fermentação nos biorreatores era estável, com a atividade alta de fermentação mantida por mais de três meses (escala de bancada: 1 litro) e seis meses (escala piloto: 1000 litros). A taxa de utilização do amido nos dois biorreatores foi de cerca de 90% .

Outro fator é que a batata-doce é considerada moderadamente tolerante à seca (SARASWATI et al, 2004) e os problemas com ervas daninhas são geralmente mínimos por causa do rápido crescimento das videiras. As desvantagens do cultivo são relacionadas principalmente a custos de arranque, especialmente mão-de-obra

associada com o cultivo. Existem, entretanto, estudos para desenvolver uma batata-doce industrial com maiores rendimentos agrícolas e de amido. Para direcionar ao uso industrial, variedades que contêm elevado teor de amido e 30% de matéria seca foram desenvolvidas por métodos convencionais de reprodução nos Estados Unidos (JUMP et al., 1944; SANTA-MARIA et al, 2009; ZISKA et al, 2009; DUVERNAY, 2008), Brasil (SILVEIRA, 2008) e China (JIN et al, 2012), para citar alguns.

Silveira (2008) estabeleceu um programa de melhoramento genético voltado para o aumento do acúmulo de biomassa da batata-doce visando à produção de etanol, desde 1997 na Universidade Federal do Tocantins (UFT/ Brasil). Foram selecionados clones com produtividade entre 28 e 65 t/ha e teores de amido entre 24% a 30%, nas condições do estado do Tocantins. Outros pesquisadores, da mesma instituição, avaliaram vários aspectos da cultura como a produtividade agrícola, adubação, teor de amido, teor de matéria seca, teor de açúcares redutores totais, rendimento em etanol, entre outros. Silva (2010a) destacou clones de batata-doce pela alta produtividade agrícola média (50,06 a 54,62 t/ha), alto teor de amido em base seca (59,57 a 62,47%), alto teor de matéria seca (30,92 a 37,92 %), médio teor de açúcares redutores totais (151,785 a 171,945 mg/g) e pelo bom rendimento em etanol (140,96 a 174,59 L/t). Silva (2010b) comparando cinco metodologias, visando o maior rendimento de etanol, verificou que a metodologia M5 apresentou o maior rendimento, na qual utilizava-se 6 Kg de batata-doce, a mesma quantidade de água, 1,5 ml de α -amilase e 0,0245 ml de glicoamilase por Kg de raiz e 25 g de fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*). Com média de 190,26 L/t quando utilizou-se a cultivar Marcela (75,05% de amido e 37,94% de matéria seca).

Algumas das pesquisas desenvolvidas por este grupo constataram que a substituição de água por soro de queijo hidrolisado possibilitou um incremento de 16,6% na produção de etanol (170 L/t de raiz para 198,90 L/t de raiz) e de 32,1% de proteína bruta no co-produto (CASTRO, 2009). Outro estudo, com o objetivo de caracterizar a divergência genética e a variabilidade fenotípica de 50 genótipos de batata-doce do Banco de Germoplasma da UFT, demonstrou que as características

de produtividade e de rendimento em etanol foram as que mais contribuíram na divergência genética, 55,09% e 23,71%, respectivamente (MARTINS, 2010). Lázari (2011), a fim de conhecer o comportamento dos fatores genéticos, avaliou 100 clones de batata-doce industrial, encontrando percentuais de matéria-seca que variaram de 27 a 40%. Quanto aos teores de amido, em base seca, os genótipos que mais se destacaram apresentaram teores superiores a 80% e mesmo os menores valores estavam acima de 60%. Foram relacionados 56 clones com os maiores rendimentos em etanol, superiores a 195 L/t e alguns clones cujos rendimentos ultrapassaram 220 litros por tonelada.

Quanto a adubação, cultivares de batata-doce (Amanda, Carolina Vitória e Duda), obtidas a partir do mesmo programa de melhoramento, foram avaliadas em função de diferentes doses de N, P₂O₅ e K₂O aplicados ao solo. As produtividades máximas obtidas para as três cultivares (Amanda: 28,48 t.ha⁻¹, Duda: 27,98 t.ha⁻¹ e Carolina Vitória: 23,09 t.ha⁻¹) foram superiores a produtividade média brasileira de 11,0 t.ha⁻¹. As doses recomendadas de N e P₂O₅ para a cultivar Amanda foram superiores àquelas recomendadas para as demais cultivares, enquanto que de K₂O a maior dose recomendada foi para a cultivar Duda (THUMÉ, 2011).

Com o mesmo objetivo, determinar o potencial de produção de etanol, quantificou-se o tipo de carboidratos da batata-doce em dois locais diferentes, quanto ao clima, nos EUA (Alabama e Maryland). Comparando com a produção de carboidratos a partir do milho, a batata-doce produziu aproximadamente 1,5x no Alabama e 2,3x em Maryland. Quanto ao rendimento de etanol produziu 8141 L/ha e 8839 L/ha, no Alabama e em Maryland, respectivamente. Se técnicas econômicas de colheita e processamento forem desenvolvidas, estes dados sugerem que a batata-doce possui potencial, como fonte de obtenção do etanol (ZISKA et al., 2009). Segundo o Departamento de Agricultura dos EUA, experimentos mostram que a batata doce possui 2-3 vezes mais carboidratos fermentescíveis que o milho (U.S.D.A., 2010).

Outro grupo de pesquisa, identificando a aptidão de genótipos de batata-doce para produção de etanol, consideraram oito genótipos aptos à produção de etanol

(GONÇALVES NETO et al., 2011), com base na produção de 158 L de etanol por tonelada de raízes processadas (SILVEIRA, 2008). Na China, investigaram o desempenho da produção de etanol, para selecionar a variedade apropriada e o período de crescimento entre as 10 variedades e deduziram que na maioria das variedades, o teor de açúcares fermentescíveis foi maior e o teor de fibra foi menor com 130 dias de crescimento. O teor de pectina de todas as variedades aumentou com um período de crescimento maior. Os consumos de matérias-primas necessárias para produzir uma tonelada de etanol anidro variaram 5,99-13,86 t, o que foi principalmente devido aos diferentes teores de açúcares fermentáveis. Para produzir uma tonelada de etanol, os requisitos de ocupação das terras variaram 0,19-0,57 ha e a quantidade de resíduo de fermentação variou de 0,43-0,96 t. Neste estudo verificou-se que o teor elevado de açúcar fermentescível e o baixo teor de fibras na batata-doce a tornam uma cultura ideal para obter uma baixa viscosidade na produção de etanol (JIN et al., 2012).

2.2.2. Mandioca

Mandioca (*Manihot esculenta*), que é nativa da América do Sul e oeste do México, foi uma das primeiras culturas a serem domesticadas e há evidências de que era cultivada no Peru há 4.000 anos atrás e no México cerca de 2.000 anos atrás (DUKE, 1983). A planta, que é uma cultura de raiz, é um arbusto de curta duração e é cultivada em quase qualquer extensão entre 30°N e 30°S de latitude (BOKANGA, 1996; WANG, 2002). Ela se adapta a temperaturas variando de 18 a 25°C, e precipitação de 50 a 5.000 mm por ano, e aos solos pobres, com pH variando de 4 a 9 (O'HAIR, 1990).

A mandioca produz rendimentos em solos pobres ou esgotados e também está bastante adaptada às áreas que possuem longa estação seca e precipitação incerta (BOKANGA, 1996; WANG, 2002; NGUYEN et al., 2006). Em função do manejo no campo e a idade de maturação, o comprimento e o peso podem variar, de 15-100 cm e de 0,5-2,5 kg. A qualidade dos nutrientes das raízes, especialmente o conteúdo de amido, aumenta com o tempo até um período ideal de 12 a 15 meses

após o plantio (BOKANGA, 2008). A mandioca pode ser colhida em 10-14 meses (DUKE, 1983), mas pelo menos, exige oito meses de tempo quente para produzir uma boa colheita (O'HAIR, 1995).

Em 2011, a Nigéria apresentou a maior produção do mundo, mais de 52 milhões de toneladas, correspondendo a mais do que o dobro da produção do Brasil (25 milhões t), segundo colocado, da Indonésia (24 milhões t) e da Tailândia (21 milhões t). No período de 1991 a 2011 a produção de mandioca aumentou cerca de 50% na Nigéria enquanto manteve-se praticamente constante no Brasil. No mesmo período, o rendimento nigeriano médio variou de 10 t/ha para 14 t/ha, enquanto no Brasil variou de 12 t/ha para 14 t/ha (FAO, 2013). Na Tailândia, a mandioca ocupa a terceira cultura mais importante economicamente, depois do arroz e da cana-de-açúcar e por isto, várias instituições têm realizado pesquisas de melhoramento da mandioca. Devido à introdução de variedades de alto rendimento e práticas de produção melhoradas, houve um aumento na produção Tailandesa de 13 t/ha em 1995 para 20 t/ha, em 2004 (FAO, 2013). O rendimento médio nas principais regiões produtoras varia entre 6,4 e 17 t/ha de raiz fresca, embora em boas condições, os rendimentos possam chegar a 90 t/ha de raiz fresca (BOKANGA, 1996).

Investigação sugere que a mandioca é uma das culturas com mais energia para produzir etanol, porque a produção de etanol de mandioca por unidade de área de terra é a maior entre todas as culturas energéticas conhecidas (WANG, 2002). Comparando com a produção de carboidratos a partir do milho, a mandioca produziu aproximadamente 1,6x a mais no Alabama 0,5x mais em Maryland, EUA (ZISKA et al., 2009). A literatura indica que cerca de 1 tonelada de raiz de mandioca fresca produz 100-200 litros de etanol (DUKE, 1983; ATTHASAMPUNNA et al., 1987; WANG, 2002; PHILLIPS et al., 2004; OHIMAIN, 2012). Outra estimativa é que 7,5 kg de raízes de mandioca frescas são necessárias para fazer 1 L de bioetanol (NGUYEN et al., 2007a) ou 2,8 t, na forma de chips, para produzir uma tonelada de etanol (YANG et al., 2011). No entanto, a FAO (2006) afirma que uma unidade de produção básica - descascadores, raladores, fermentadores e um destilador - pode

produzir cerca de 280 L, a 96% de etanol, por tonelada de mandioca, com teor de amido de 30%.

A raiz fresca, que contém cerca de 70% de água (COLOMBIA, 2007), não pode ser armazenada por muito tempo porque apodrece dentro de 2 a 4 dias, após a colheita (NWEKE, 1996; BOKANGA, 2008). Uma vez colhida, a mandioca deve ser rapidamente processada a um produto mais estável, tais como chips de mandioca, onde a mandioca é cortada em lascas de tamanhos uniformes e secos ao sol. A energia total utilizada para a produção de 200 kg de farinha a partir de 1000 kg de matéria-prima é de 346 MJ, sendo que somente a etapa de ralar consome 232 MJ (JEKAYINFA; OLAJIDE, 2007). A cultura de raiz é muito rica em carboidratos, cerca de 30 % (ASIEDU, 1989), dos quais 25 a 40% são de amido (O'HAIR, 1995). Cerca 0,34 t chips de mandioca podem ser produzidos de 1 t de mandioca fresca (YANG et al., 2011).

Aproveitando este potencial, na China uma unidade fabril com uma capacidade de produção anual de 200 mil toneladas foi construída no final de 2007 (ZHANG et al., 2010b). Ao contrário de destilarias à base de sacarose que são operados sazonalmente, a indústria do etanol baseada na mandioca pode operar continuamente, além de sua capacidade de ser armazenada como chips secos. Quanto ao potencial de abastecimento, do total da produção anual de mandioca, na Tailândia, por exemplo, 20 MT, aproximadamente 40% são absorvidos pela indústria de amido e outros 40% são processados para chips e pellets, principalmente para exportação. Os 20% excedentes são utilizados, principalmente para aplicações na alimentação animal (CSTRU, 2004). Desde 2001, a fim de aumentar a competitividade do etanol com gasolina, o governo tailandês aprovou a isenção de imposto de consumo colocada sobre o etanol, controlando o preço de varejo de "gasohol" (mistura de etanol e gasolina na proporção de 1:9). As políticas governamentais de etanol incluem a isenção de imposto especial sobre o consumo e a renúncia do imposto de renda para investidores interessados (NGUYEN et al., 2007a). Bastante confiante sobre fontes abundantes de matérias-primas para a

produção de etanol, este governo lançou um projeto para substituir a gasolina com "gasohol" nacional em janeiro de 2007 (NGUYEN et al., 2006).

O Governo Federal da Nigéria, também, anunciou recentemente a substituição parcial dos combustíveis para cozinhar com bioetanol produzido a partir da mandioca em um projeto chamado "cassakero". O projeto envolve a instalação de 10 mil micro-biorrefinarias em todo o país, com uma capacidade combinada de 4 milhões de litros por dia. O projeto inclui a criação de uma fazenda com 400.000 ha de mandioca para fornecer matéria-prima para as refinarias de etanol. OHIMAIN (2012) cita que o projeto vai ser benéfico em termos de criação de emprego, estímulo à agricultura rural, conservação da floresta da exploração de lenha, alívio da pobreza e prevenção da poluição interior. Entretanto, enquanto o etanol combustível liberará menos CO₂ comparativamente, a conversão de 400.000 ha de mandioca para etanol e o uso de agroquímicos também irão liberar CO₂. Além do grande gasto de água, de energia e a produção de resíduos, que precisam ser tratados.

Uma análise de energia dos gases de efeito estufa (GEE) foi realizada para avaliar o etanol combustível produzido a partir da mandioca na Tailândia, concluindo que a produção de 1 L de etanol de mandioca (CE) substituindo 0,89 litros de gasolina comum (CG) resultaria em economia de energia de 22,38 MJ o que corresponde a cerca de 0,58 L de gasolina comum. A estimativa mostra que, com uma capacidade de produção diária de 3,4 ML do CE substituindo CG no transporte, a Tailândia pode economizar cerca 720 ML de CG por ano. O balanço de energia para a produção de etanol a partir de mandioca mostrou-se positivo. As emissões de gases do efeito estufa a partir de CE na Tailândia são cerca de 0,96 kg/L de etanol, contra 2,6 kg de CO₂ eq. quando utiliza a gasolina comum (NGUYEN et al., 2007a).

Estudo com o objetivo específico de estimar os impactos sobre estoques de carbono acima do solo após uma mudança no uso da terra para crescente produção de mandioca, para bioetanol, foi realizado no sul de Mali. Os resultados mostram que a conversão de áreas de descanso para o cultivo da mandioca resultam em um déficit de carbono de 6,4 a 7,1 Mg/ha, quando os agricultores mantêm as árvores úteis e levaria entre 12 e 14 anos para compensá-los. Mostra, também, que

assumindo uma remoção total da biomassa acima do solo, ao tomar estas áreas para o cultivo, irá resultar em uma estimativa de 21 a 25 anos. Se os agricultores substituírem outras culturas pela mandioca, há pouca ou nenhuma redução nos estoques de carbono acima do solo, uma vez que as árvores nos campos não são afetadas, assim, não haveria débito de carbono (RASMUSSEN et al., 2012).

Sobre o consumo de energia por segmentos, envolvidos no sistema de CE, Nguyen et al. (2007b) encontraram que a conversão em etanol consome 55,5% (6,69 MJ/L) das entradas totais de energia fósseis, o cultivo de mandioca e processamento consomem 32,4% (3,91 MJ/L) e o transporte contribui com 12,1% (1,46 MJ/L). Dos elementos fertilizantes, o N contribui com o maior consumo de energia e a energia do trabalho humano é responsável por quase 29%. Outro estudo quanto ao sistema de produção agrônômica apresentou um dispêndio energético de 9.528,33 MJ/ha, nas operações de cultivo consumiu-se 1,54 MJ/L, no processamento industrial de uma tonelada de matéria-prima 2.208,28 MJ/t, entretanto, apresentou um custo de 11,76 MJ/L relacionado ao etanol produzido (SALLA, 2008). Segundo Dai et al. (2006) a conversão de etanol combustível contribui com 71,11%, a plantação 25,91%, a energia hidrelétrica correspondeu a 2,43% (0,406 MJ/L) e o carvão e gás natural com 84,65% (14,165 MJ/L) das entradas totais de energia.

Dai et al. (2006) chegaram a conclusão que 1 J de combustível de petróleo, além de outras formas de entradas de energia, pode produzir 9,80 J de etanol combustível; e que trata-se de energia renovável e eficiente como indicado pelo NEV (energia líquida) e NREV (valor líquido de energia renovável) positivos, que eram 7,475 MJ/L e 7,881 MJ/L, respectivamente. Enquanto no estudo de Nguyen et al. (2007b) o valor do NEV e do NREV, foram de 8,80 MJ/L e 9,15 MJ/L, respectivamente, na Tailândia, mostrando-se eficiente energeticamente. Sem créditos de energia para o co-produto, o CE, na Tailândia é ainda mais eficiente do que na China e etanol de milho nos Estados Unidos.

Outro tipo de análise energética; referente à soma das entradas de energia disponível de determinado tipo, direta ou indiretamente, para fazer um produto ou serviço (índices energéticos); evidencia que 213 kWh de eletricidade e 0.5 t de

carvão são necessários para produzir 1 t de etanol. Os resultados mostram que os fertilizantes nitrogenados (25%), carvão (20%) e trabalho (20%) são os principais insumos de toda a energia que flui no sistema de produção do CE. Comparado com os índices energéticos de etanol de trigo e de milho, CE mostra-se o mais sustentável, mas não totalmente renovável, pois sua produção ainda consome muito recursos não-renováveis (71,15%) (YANG et al., 2011).

Em uma investigação acerca dos custos de produção do etanol a partir da mandioca, em comparação com a gasolina, com base em uma abordagem de ciclo de vida foi demonstrado que o preço da matéria-prima é o fator dominante, representando 54%, enquanto a conversão a etanol contribui com cerca de 46%. Uma redução no preço da mandioca e na utilização dos subprodutos seria uma maneira possível para reduzir o custo de produção do etanol. Este preço relativamente elevado do etanol é, em parte, devido às muitas etapas envolvidas no ciclo de produção de combustível (NGUYEN et al., 2006).

No momento, parece que sem os subsídios do governo o etanol não pode competir com a gasolina em termos de preço. No entanto, o rendimento da mandioca melhorada e o desenvolvimento do mercado iriam favorecer o potencial do etanol para substituir a gasolina, a longo prazo. Além disso, esta fonte de energia renovável poderia fornecer um mercado estável para os agricultores de mandioca, bem como contribuir para os objetivos de política ambiental e de energia (NGUYEN et al., 2006).

Para tornar o processo sustentável os resíduos precisam ser tratados ou transformados em co-produtos com valor agregado. Em um estudo de um novo processo de reciclagem completa, por meio de duas fases de tratamento anaeróbico foi proposto para o tratamento de águas residuais da destilaria de produção de etanol de mandioca. As substâncias inibidoras na água reutilizada permaneceram relativamente estáveis após 3 ou 7 tratamentos e na reciclagem do processo, o que coincide com os resultados de modelos matemáticos. Não se observaram efeitos negativos sobre a fermentação de etanol e no rendimento final de etanol. E o tempo de fermentação e taxa de utilização de amido foram muito próximas à do processo convencional, utilizando a água da torneira. No entanto, cerca de 7% (p/p) de água

foi perdida durante cada circulação, a qual foi repostada nas bateladas subsequentes, para assegurar o volume de fermentação constante. Utilizando este processo foi possível reutilizar a água por mais 13 vezes (ZHANG et al., 2010b).

Como exemplo de agregação de valor dos co-produtos pode-se citar que no processo de fabricação do amido da mandioca, grandes quantidades de resíduos sólidos, chamados de polpa de mandioca, são produzidas. Os principais componentes da polpa de mandioca são amido (aproximadamente 60%) e celulose (aproximadamente 30%). Estudaram-se a sacarificação e fermentação simultâneas de polpa de mandioca com uma estirpe de levedura que apresenta duas enzimas amilolíticas e duas enzimas celulolíticas, na superfície da célula. A concentração máxima de etanol de 10,0 g/l foi alcançada após 48 horas de fermentação, com rendimento de 79,4%. Estes resultados mostraram que ocorreu a sacarificação e fermentação simultâneas do amido e componentes celulósicos da polpa de mandioca, embora a utilização de fibras celulósicas não tenha sido suficiente (APIWATANAPIWAT et al., 2011).

2.2.3. Milho

O milho (*Zea mays*) é uma planta C4 da família das gramíneas, com ciclo produtivo anual. Os grãos representam cerca de 50% da matéria seca da planta, que ainda conta com o colmo, as folhas, a palha e o sabugo (PORDESIMO et al., 2004). É originário do México, mas é cultivado atualmente em todos os continentes.

Os Estados Unidos lideram a produção de milho em todo o mundo e respondem por mais da metade do volume produzido. Em 2011, a produção americana foi superior a 313 milhões de toneladas de grãos, para uma área colhida de pouco mais de 33 milhões de hectares. O volume de produção aumentou cerca de 40% e a área 18% em relação a 1991 (FAO, 2013). Do total produzido, mais de 36% foi destinado à alimentação animal, enquanto a indústria de bioetanol consumiu 28% e 11% da produção foi destinada a produção de DDGS a partir do etanol (IOWA CORN, 2012). Dentro dos Estados Unidos, a produção se concentra na região chamada de Cinturão do Milho, com destaque especial para os estados de Iowa e

Illinois. A China vem ganhando espaço e sua produção cresceu mais de 50% no período de 1991 a 2011, pulando de 99 milhões toneladas para 192 milhões de toneladas. E já ocupa o lugar de segundo maior produtor mundial. No Brasil, terceiro maior produtor, a produção estava em ascensão até 2008 com quase 59 milhões de t, enquanto em 2010 e em 2011 a produção foi cerca de 55 milhões de toneladas, 57% maior do que em 1991. O preço também apresenta crescimento, de 1990 a 2010, mais que duplicou nos Estados Unidos e na China e no Brasil ficou 1,5 vezes maior (FAO, 2013).

O milho pode ser convertido em etanol basicamente por dois processos: moagem úmida ou seca. Na moagem úmida, a semente de milho é fracionada em componentes primários (fibra de germe, óleo e amido), o que resulta em processo de várias correntes e co-produtos. A moagem úmida exige equipamentos e investimento intensivo, e gera grandes volumes de etanol. No processamento de moagem seca, a semente de milho não é fracionada e apenas um co-produto é produzido, usado para a alimentação animal, o DDGS. As plantas de moagem a seco requerem menos equipamentos e menos investimentos (RFA, 2007). Quando o etanol surgiu, em 1970, a média de produção de milho era cerca de 3170 L por acre (SHAPOURI et al., 2002). O balanço de massa do grão de milho seco define a eficiência da conversão teórica para etanol em 0,423 L de por kg de matéria seca ou a 2,85 galões por bushel seco, que é correspondente 2,42 galões por bushel equivalente de milho com 15% de umidade. Portanto, segundo estimativa da USDA a eficiência de conversão, 2,66 litros por bushel deve ser aplicado ao milho seco, e não ao milho com 15% de umidade (PATZEK, 2004).

A análise do ciclo de carbono, nos EUA, mostra que em 2004 a produção de etanol a partir de milho gerou 8 milhões de toneladas de CO₂, além da quantidade gerada pela queima da gasolina. Estima-se que em 1 ha de etanol de milho industrial gera 6.700 kg de CO_{2equiv}, sendo de 1600 kg/ha acima das emissões da gasolina. Para satisfazer 10% do consumo de combustível dos EUA, as emissões adicionais de CO₂ serão de cerca de 65 milhões de toneladas métricas por ano. Enquanto que, analisando o total de emissões de gases do efeito estufa (GEE), na China verifica-se

que 27% ocorrem no processo agrícola, enquanto 14% na conversão industrial de milho em etanol, e 59% devido ao tratamento de águas residuais. Por outro lado, 82% das emissões totais de GEE são lançadas diretamente na cadeia produtiva, enquanto 18% são do consumo fóssil indireto. Aborda-se que o etanol de milho emitiria 5,99 vezes mais CO₂ do que a gasolina comum (11,61 kg CO₂-equiv./kg etanol de milho contra 2,98 kg CO₂-equiv./kg) (YANG; CHEN, 2012). Outro estudo comparando o impacto ambiental da gasolina, em 19 estados dos EUA, mostrou que E85 gera aproximadamente 6% a 108% (23% em média) mais impacto do que a gasolina, dependendo de onde o milho é produzido, principalmente porque induz impactos de eutrofização significativos e requer irrigação intensiva. Se as emissões de gases de efeito estufa a partir das mudanças do uso indireto da terra são consideradas, as diferenças aumentam para 16% a 118% (33% em média) (YANG et al., 2012).

Quanto ao gasto energético do processo, etapas de concentração e destilação do xarope utilizam a maior parte da água de arrefecimento. A destilação requer 2.090 quilowatts (kW) de potência, destes, 53% são para a separação de sólidos/secagem em equipamentos de evaporação do xarope, 7% para as bombas de fermentação, enquanto que os moinhos e outros equipamentos de manuseio dos grãos usam 8%. Se levados em consideração, os co-produtos podem ter um impacto substancial sobre a viabilidade econômica (NREL, 2000). Salla (2008) em uma análise energética de sistemas de produção de etanol no estado de São Paulo-Brasil, demonstraram que o sistema de produção agrônômica apresentou um dispêndio energético de cerca de 15 mil MJ/ha e que em relação ao etanol produzido, as operações de cultivo consumiram 7,9 MJ/L. A análise também apontou que o processamento industrial de uma tonelada de matéria-prima, apresentou um custo energético de quase 4 mil MJ/t e de 11,76 MJ/L quando relacionado ao etanol produzido. No balanço energético final para cada MJ de energia investido no milho foram requeridos 1,19 MJ (19%).

Outro ponto importante da cadeia é identificar os fatores que causam variação no valor de energia líquida (NEV). Assim, um estudo explicou que o NEV do etanol

de milho, nos EUA, aumentou ao longo do tempo, devido aos avanços tecnológicos na conversão do etanol e ao aumento da eficiência na produção agrícola. Mostrou-se que o etanol de milho é energeticamente eficiente, razão de 1,34, sendo 1,30 a partir da moagem úmida e para a moagem seca de 1,37. Cerca de 80% do total das necessidades energéticas vêm dos combustíveis não-líquidos e 17% dos combustíveis líquidos. Assim 1 Btu do combustível fóssil líquido pode produzir 6,34 Btu de etanol (SHAPOURI et al., 2002).

Em um relatório que avalia o setor de milho nos EUA, em vários cenários (Base; 1: 7 bilhões de galões; 2: 14 bilhões de galões; 3 alto preço da gasolina; 4: baixo preço da gasolina; 5: perda de subsídios), há a previsão que as alterações na produção de etanol terão impacto sobre a produção, no uso na alimentação animal e nas exportações, assim como no nível geral de preços (TAYLOR et al., 2006). Um outro estudo realizado por Serra et al. (2008) indica a existência de uma relação de equilíbrio entre os preços do milho, do etanol e do petróleo. No entanto, os preços do etanol são ajustados, de forma não-linear, a desvios a longo prazo, indicando que um choque nos preços do petróleo e do milho provoca uma mudança nos preços do etanol na mesma intensidade, esta resposta geralmente atinge um pico após cerca de 10 dias e desaparece dentro de 35 dias.

Um dos fatores mais considerados na utilização de uma determinada matéria-prima são os custos de produção do biocombustível derivado desta. Portanto, pesquisa demonstra que os custos de processamento de etanol de milho, nos EUA, caíram 45% desde 1983 e o volume de produção aumentou 17 vezes. No mesmo período, os custos de produção do etanol de milho (incluindo custos de matérias-primas e custos de processamento) diminuíram cerca de 70%, enquanto os custos de processamento industrial de etanol de milho caíram 45%. As reduções nos custos das matérias-primas de álcool de milho podem ser atribuídas principalmente ao aumento da produtividade do milho por unidade de área e da dimensão média das plantações de milho (HETTINGA et al., 2009). A análise dos fatores que contribuem para o declínio nos custos revela que a decomposição da produção anual de etanol de milho e a prática de aprender fazendo, juntos, representaram 95% da variação

nos custos de processamento, enquanto a cumulativa importação de etanol de cana contribuiu para 4%. Os custos de energia e trabalho são encontrados para explicar de 0,8% a 3,4% e de 0,2% a 0,9% de redução nos custos de processamento, respectivamente, dependendo das especificações do modelo (CHEN; KHANN, 2012). Outro texto, deixa claro que os custos para a produção de etanol a partir de amido de milho e o custo de destilaria com moagem seca diminuíram, podendo ser atribuídas a vários fatores como o fato da produção de etanol requerer menos energia, devido a novas técnicas de uso da energia e para a desidratação do etanol, além do fato da quantidade de etanol puro produzido a partir da mesma massa de milho ter aumentado (NREL, 2000).

O volume de águas residuais geradas no processo é importante para a viabilidade do mesmo. Ycadi (2003) documentou que, na China, 40 milhões de m³ foram produzidos quando se obteve etanol de 2,10 milhões de toneladas, em 2002. Aproximadamente, 1 kg de etanol gera 18,80 L de águas residuais com uma concentração média de DBO de 55,00 g/L (JIA; YING, 2005), que precisam ser tratadas. Com base em um levantamento do consumo de energia em instalações de tratamento de águas residuais municipais na China, o consumo de energia elétrica média foi de 1.30 kWh/kg de DBO removida no processo de tratamento de águas residuais (WANG et al., 1992). No geral, um valor médio de consumo de energia elétrica para o tratamento de águas residuais é de 1,34 kWh/kg de etanol (ou 4,84 MJ) (YANG; CHEN, 2012). Para determinar a quantidade gerada avaliou-se a necessidade de água para produção de etanol a partir de grãos de milho e chegou-se a conclusão de que o etanol consome de 50 a 146 L de águas superficiais e subterrâneas por km rodado de 1 a 60 L água de precipitação/km rodado, para uma cultura irrigada de milho. Enquanto que sem irrigação consome de 0.6 L/km rodado de águas superficiais e subterrâneas e de 70 a 137 L/km rodado de precipitação, após os créditos do co-produto. Estima-se que, em 2009, 15 a 19% de água de irrigação sejam usadas para produzir a quantidade de milho necessário para obter etanol no Kansas e em Nebraska, sem créditos para os co-produtos, e que 8-10% após os créditos (MISHRA; YEH, 2011). Estima-se que seja necessário 30–37 L no

processo de limpeza, 10-12 L no fracionamento de milho e 20–25 L para a fermentação, para cada litro de etanol (PATZEK, 2004).

Assim há matérias-primas amiláceas com potencial para a produção de etanol combustível. Porém, o amido necessita passar por um processo hidrolítico preliminar à fermentação, pelo qual seja convertido em açúcar fermentescível. Uma das formas de promover esta alteração é utilizar enzimas específicas.

2.3. Aplicação da hidrólise enzimática em amiláceas

Grânulos de amido possuem dois polímeros de glicose: a molécula linear, amilose, e a cadeia ramificada, amilopectina. A amilose quase não contém ramificações, sendo que as unidades de glicose são conectadas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e a quantidade de ramificações α -1,6 é menor do que 1% (BALL et al., 1998; CHEOL; JOHN, 2002). A amilopectina possui ligações glicosídicas do tipo α -1,4 com aproximadamente 5% de ramificações α -1,6 (MYERS et al., 2000). Dependendo da origem botânica, o amido possui diferentes proporções de amilose e de amilopectina, normalmente variando em torno de 1:3 e 1:4, mas há extremos encontrados, como em algumas variedades de milho, cujo amido não possui amilose (NELSON; PAN, 1995).

A amilopectina e a amilose podem ser atacadas de forma endo, no centro da molécula, ou exo, na porção terminal não redutora da molécula. O ataque endo é efetuado pela α -amilase (EC 3.2.1.1) responsável pela quebra de ligações do tipo α -1,4, internas à molécula, mas ignora as ligações do tipo α -1,6. Esta age sobre o grânulo de amido intacto, produzindo glicose, maltose e algumas dextrinas de alto peso molecular. As α -amilases possuem um peso molecular variando de 5×10^4 a 6×10^4 g/mol, e o pH e a temperatura ótimos para a atividade dependem da origem da enzima. Em seguida, os oligossacarídeos (maltodextrinas) formados pela ação da α -amilase são quebrados pelas exo-glucanases. O amido também pode sofrer ação de uma exo-enzima, a β -amilase (EC 3.2.1.2), que pode liberar unidades de maltose a partir do final não redutor e da cadeia linear, mas não pode ignorar as ligações α -1,6. Amiloglicosidase (EC 3.2.1.3), também chamada de glicoamilase possui ação exo e

peso molecular variando de 10^6 a 10^8 g/mol, hidrolisa as últimas ligações glicosídicas α -1,4 no final não-redutor da amilose e da amilopectina, bem como as ligações α -1,6 da amilopectina, mas a taxa de hidrólise das ligações do tipo α -1,4 é maior do que do tipo α -1,6. Há enzimas que hidrolisam apenas ligações α -1,6, a pululanase (EC 3.2.1.41), outras enzimas desramificadoras e ainda as que rompem preferencialmente α -1,4 em oligossacarídeos de cadeia curta, como as glicosidases (EC 3.2.1) (COLONNA et al., 1992; MORIYAMA; IKEDA, 1996; RUSSO et al., 2009).

Estes polímeros formam uma estrutura em camadas alternadas com regiões amorfas e cristalinas de baixa e alta densidade (JACOBS et al., 1998). São densamente ligados por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares, formando um estado policristalino que os torna insolúvel em água fria e, muitas vezes, resistentes a agentes químicos e enzimáticos (MITSUIKI et al., 2005). A cristalinidade é o resultado da formação de duplas hélices entre as cadeias de amilopectina e de amilose (VERMEYLEN et al., 2006; TESTER et al., 2004).

A Liquefação e sacarificação requerem que os grânulos de amido sejam amplamente gelatinizados, geralmente, a altas temperaturas. Sarikaya et al. (2000) afirmam que, na maioria dos casos, a ação da α e β -amilases não é eficaz em grânulos de amido nativo porque são muito resistentes à digestão amilolítica e é necessário um longo período de hidrólise para degradá-lo. Sabendo-se que adsorção da enzima amilolítica sobre o grânulo é a etapa inicial para a hidrólise enzimática (LELOUP et al., 1991; KONG et al., 2003), Martín e López (2009) verificaram que o amido modificado fisicamente pelo calor úmido é mais facilmente hidrolisado por α -amilase que amidos nativos, já que a gelatinização provocou um aumento da susceptibilidade às enzimas amilolíticas.

Por se tratar de bioprocessos bastante utilizados na indústria, diversos trabalhos foram realizados a fim de otimizar este método e alcançar uma maior eficiência, pela determinação dos melhores parâmetros (LIU, 2002; APAR; ÖZBEK, 2004a; 2004b; APAR & OZBEK, 2005; BASKAR et al., 2008), utilização de menores temperaturas (SHARIFFA, et al., 2009; YINGLING, et al., 2011), determinação da influência de outros compostos, como o complexo amilose-lipídios (NEBESNY et al.,

2002; 2004) e grupo fosfato (MARSHALL; WHELAN, 1970; ABSAR et al., 2009), liquefação por extrusão (LINKO et al., 1983; DARNOKO et al., 1989; GOVINDASAMY et al., 1997), preparação enzimática bruta (KOUTINAS et al., 2001; KUNAMNENI; SINGH, 2005); aumentando o teor de matéria seca (VAN DER VEEN et al., 2006; TESTER; SOMMERVILLE, 2000).

Sobre a determinação dos melhores parâmetros pode-se citar a pesquisa de Liu (2002) que investigou a hidrólise do amido da polpa da batata e demonstrou que o amido poderia ser totalmente hidrolisado utilizando uma relação constante de α -amilase/amiloglicosidase de 15:1. Quanto ao efeito da temperatura, pode-se constatar que os valores de atividade enzimática residual e de hidrólise obtidos para cada amido (arroz, milho e trigo) diminuíram com o aumento da temperatura (50-60 °C). Os menores valores foram obtidos para α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* e os maiores para a proveniente do *Bacillus licheniformis* (APAR; OZBEK, 2004a). Os mesmos autores, em outro estudo, avaliaram os efeitos das condições de processo e adição de materiais. Encontraram como valores ótimos, para grau de hidrólise do amido de milho: 65°C, pH de 5,0-6,5, 300 rpm, 90 min de reação (APAR; OZBEK, 2004b). Ao analisar o amido de arroz concluíram que o valor da temperatura ótima, do pH e do tempo foram similares (65 °C, 6,5, 90 min, respectivamente), enquanto a velocidade ideal foi de 200 rpm e a concentração de enzima entre 1,2-2,0 g/L. O aumento da viscosidade, da concentração de maltose e glicose beneficiaram a atividade enzimática (APAR; OZBEK, 2005).

Outro estudo foi aplicado para a otimização dos parâmetros da hidrólise enzimática da farinha de mandioca. Os autores encontraram como valores ideais: 4,5% (p/v), 1% (p/v), 45 °C, e 150 min, para a concentração de amido, concentração de enzima, temperatura e tempo, respectivamente e o rendimento previsto de glicose de 5,17 mg/mL. O experimento foi conduzido, obtendo-se um percentual 3,48 superior ao previsto, o que revela uma alta precisão do modelo matemático (BASKAR et al., 2008).

Experimentos com o objetivo de diminuir a temperatura empregada na hidrólise, trazendo assim benefícios tais como: economia de energia e água foram

concluídos. Um destes, utilizando-se de superfície de resposta, visando otimizar as condições de hidrólise enzimática de amido de mandioca em baixas temperaturas. Yingling et al. (2011) verificaram que existe a necessidade de maior concentração de enzima, uma vez que a concentração de etanol aumentou com quantidades crescentes de glicoamilase. No entanto, manteve-se quase constante quando o tempo de liquefação foi maior que 10 min e que interações positivas e significativas existem entre taxa de utilização de amido, α -amilase e temperatura. Encontraram valores ótimos para α -amilase (214 - 264 IU/ g de amido), glicoamilase (392 - 694 IU/g de amido), temperatura (60 - 79 °C) e tempo (103 - 108 min) que resultavam em alta taxa de utilização do amido (92,50 - 94,64%).

Shariffa et al. (2009) demonstraram que após 24 h de hidrólise a 35 °C, o amido de mandioca, tratado termicamente, apresenta a maior taxa de dextrose equivalente, pois, evidentemente, tratar o amido com o calor suave antes aumenta significativamente o grau de hidrólise. Demonstraram, também, que embora os amidos mostrassem padrões similares de difração de raio-X, o hidrolisado de amido tratado termicamente mostra um caráter mais cristalino.

Outro aspecto é a presença de complexos amilose-lipídios (AML) que impedem o acesso das enzimas amilolíticas aos grânulos de amido, aspecto investigado por Nebesny et al. (2002) que demonstraram que a digestão enzimática prolongada da suspensão de amido de trigo com a mistura enzimática de amilase e lisofosfolipase causou um aumento na concentração de ácidos graxos no hidrolisado, sendo que utilizando esta mistura, um grau maior de degradação da AML pode ser alcançado e que a eficiência deste processo depende do tempo de reação. Os mesmo autores, (NEBESNY et al., 2004) em pesquisa destinada a elucidação das propriedades do complexo amilose-lipídico (AML) e sua relação com características dos hidrolisados de milho, demonstraram que a temperatura de dissociação da AML varia de 80 a 100°C. A análise de raio-X do amido nativo apresenta o espectro do tipo A, apontando para a presença de AML neste amido. Concluindo que a sacarificação com glicoamilase juntamente com lisofosfolipase, origina uma clivagem mais acentuada de AML, em comparação com a com glicoamilase sozinha.

Mais um ponto abrangido é o fato de alguns amidos conterem pequenas quantidades do grupo fosfato ligadas a seus componentes (POSTERNAK, 1951; HIZUKURI et al., 1970; TABATA; HIZUKURI, 1971) que estão localizados principalmente na amilopectina (TAKEDA; HIZUKURI, 1982). Como enzimas amilolíticas são incapazes de contornar o resíduo fosforilado glicosilados, fosforil-oligossacarídeos são liberados a partir da hidrólise (ABE et al., 1982; TAKEDA et al., 1983). Assim Marshall e Whelan (1970) recomendaram que traços de α -amilase devem estar presentes numa preparação de glicoamilase, para a conversão do amido em glicose. Trabalhando com amidos de batata com alto conteúdo de fósforo Absar et al. (2009) verificaram, claramente, que o amido com alto teor de fósforo é comparativamente mais resistente à hidrólise por α -amilase do que o amido com baixo teor de fósforo.

O tempo de sacarificação também é exaurido, pois sua diminuição pode acarretar cortes de gastos tantos energéticos quanto financeiro. Estudos demonstram que ele pode ser reduzido quando o amido é pré-tratado utilizando liquefação por extrusão. Linko et al. (1983) utilizaram uma extrusora, dupla-rosca, em amido de cevada, com 10 a 40% de α -amilase de *Bacillus licheniformis* e observaram que era rapidamente sacarificado, dentro de 24 h, em 94-95% de dextrose equivalente, utilizando glicoamilase de *Aspergillus niger*. Estes autores verificaram que o tempo de sacarificação pode ser reduzido para 4 h usando um processo de sacarificação semi-contínuo. Sacarificação rápida, em torno de 2,5 h, pode ser realizada por hidrólise contínua de fécula de mandioca extrudada com glicoamilase em um reator de ultrafiltração (DARNOKO et al., 1989). Govindasamy et al. (1997) investigaram a suscetibilidade de amostras de amido liquefeito para a ação da glicoamilase e observaram a que α -amilase promove, durante o processamento de extrusão, uma ação sinérgica, beneficiando a atividade da glicoamilase.

A possibilidade de utilizar enzimas que não sejam purificadas pode acarretar a vantagem de não comprá-las. A partir de um trabalho experimental, demonstrou-se que a utilização de um complexo enzimático bruto de *Aspergillus awamori* em um reator de membrana contínua enzimática foi altamente eficiente em concentrações

baixas de amido (2%), enquanto em uma concentração maior (7%), a operação foi prejudicada devido ao acúmulo de sólidos no sistema (KOUTINAS et al., 2001). Kunamneni e Singh (2005) usando preparações brutas de amilase, sobre o amido de milho, obtiveram valores ótimos de: dose de α -amilase no pré-cozimento 2,243 U/mg, dose de α -amilase no pós-cozimento de 3,383 U/mg, dose de glicoamilase 0,073 U/mg a 55,1 °C, onde a eficiência de conversão máxima (96,25%) foi alcançada.

Por fim um dos alvos de investigações é a quantidade de água consumida durante a reação de hidrólise. Sabendo-se que a quantidade teórica de água que é necessária para a completa hidrólise do amido em glicose é definida como o ganho químico (MARCHAL et al., 1999) e que o processo de gelatinização desfaz as duplas hélices pois, as pontes de hidrogênio são rompidas, as regiões cristalinas são convertidas em regiões amorfas, os grânulos continuam absorvendo água e incham, como consequência estes perdem a forma granular e tendem a gelatinizar (aproximadamente 4% de sólidos) e/ou solubilizar (menor que 4% de sólidos) (TESTER; KARKALAS, 2006). Com a finalidade de reduzir o teor de água durante o processo de hidrólise Van Der Veen et al. (2006) investigaram as condições com baixa umidade (<43%). Os resultados obtidos indicam que o aumento do teor de matéria seca (35% - 65%) resultou em uma produtividade 17% maior, enquanto que a quantidade de água a ser removida do sistema foi reduzida em 87%, com temperatura e tempo de processamento comparáveis aos atuais processos industriais. A principal desvantagem é o aumento da formação de isomaltose, que pode chegar a 8% do teor de matéria seca.

2.3.1. Fatores do processo que alteram a Hidrólise Enzimática

A literatura traz diversos fatores que influenciam a hidrólise enzimática tais como: a dosagem de enzimas, o tamanho dos grânulos, a concentração e a composição do substrato. Dentre os fatores que beneficiam o acesso das enzimas está o tratamento térmico (MARTÍN; LÓPEZ, 2009; LEWANDOWICZ; SORAL-SMIETANA, 2004; ABSAR et al., 2009; SHARIFFA, et al., 2009). Este acesso é dificultado pelas interações entre os constituintes dos polímeros (MARTÍN; LÓPEZ,

2009), pela presença de complexos amilose-lipídios e do grupo fosfato (ABE et al., 1982; TAKEDA et al., 1983; ABSAR et al., 2009; NEBESNY et al., 2002), e pela relação entre a área superficial e o volume (TESTER; QI, 2004).

Quanto à atividade enzimática estão envolvidos o tempo e a temperatura (APAR; OZBEK, 2004b; APAR; OZBEK, 2004a), o pH (THOMAS; ATWELL, 1999), o aumento da viscosidade, o aumento da quantidade de maltose e da concentração de glicose (APAR; OZBEK, 2004b). Já a quantidade de amilase utilizada está interligada com o diâmetro dos grânulos (LIU, 2002; TESTER; QI, 2004; ABSAR et al., 2009; KIM et al., 2008), teor de amilose (RENDLEMAN, 2000; EVANS; THOMPSON, 2004; ABSAR et al., 2009), teor de umidade (ABSAR et al., 2009). A forma e o tamanho dos grânulos de amido ainda variam de acordo com a fonte botânica (TESTER et al., 2004; KIM et al., 2008), o que acarreta mais variações nos processos.

Estes parâmetros alteram o processo de várias formas distintas. O processo de gelificação facilita o acesso, devido à dissociação da dupla hélice (MARTÍN; LÓPEZ, 2009). Isto ocorre, pois se acredita que os níveis utilizados de umidade, relativamente elevados, facilitam a hidratação e inchaço, promovendo a mobilidade e atividade da enzima (GOVINDASAMY et al., 1997). O calor aumenta a adsorção de α -amilase (KURAKAKE et al., 1996), pois ocorre a interrupção da ligação de hidrogênio entre as cadeias, enfraquecendo assim o grânulo, de modo que a enzima pode penetrar e degradá-lo (SHARIFFA, et al., 2009).

As duplas hélices que formam as entidades cristalinas são semelhantes, mas o padrão de difração de raios-X do tipo A é mais compacto e com baixo teor de água, enquanto o tipo B possui uma estrutura mais aberta e maior hidratação. Além disto, o comprimento da corrente é maior no tipo B. O padrão de difração tipo C representa uma combinação de A e B (MARTÍN; LÓPEZ, 2009).

No processo de hidrólise enzimática do amido, a presença de complexos amilose-lipídios (AML) diminui o inchaço, a capacidade de dissolução e a capacidade de ligação, impedindo o acesso das enzimas amilolíticas (NEBESNY et al., 2002). Amidos com alto teor de amilose são especialmente resistentes (GALLANT et al.,

1992) pois a amilose, geralmente, representa a região amorfa (TESTER; KARKALAS, 2006).

Quanto ao tamanho, sabe-se que este se modifica de acordo com a origem botânica (TESTER et al., 2004; KIM, et al., 2008). Grânulos de amido de cereais (como milho ou trigo), são geralmente pequenos e poliédricos, enquanto de batata são elípticos, e os de leguminosas (ervilha, por exemplo) são ovais. Os tamanhos dos grânulos variam entre menor que 5 μm de diâmetro (por exemplo, arroz), até maior que 80 μm de diâmetro (por exemplo, batata) (ZOBEL, 1998). O tamanho do amido nativo pode ser reduzido, selecionando a hidrólise na região amorfa (MA et al., 2006). Mostrou-se que maiores grânulos de amido são digeridos mais lentamente do que grânulos menores (ABSAR et al., 2009).

2.3.2. Métodos aplicados para análise

Uma série de métodos foi desenvolvida para a determinação do teor de amilose. Aqueles empregando espectrofotometria (KNUTSON, 1986; CHRASTIL, 1987; JARVIS; WALKER, 1993; MARTINEZ; PRODOLLIET, 1996) são, provavelmente, os mais utilizados, métodos usando calorimetria diferencial de varredura (DSC) (SALIERI et al., 1995; NEBESNY et al., 2004; SHARIFFA et al. 2009), cromatografia de Alta Performance de exclusão por tamanho (HPSEC) (GRANT et al., 2002) e digestão enzimática (YUN; MATESON, 1990) foram desenvolvidos. Em cada um destes métodos a preparação de amostras, soluções utilizadas, e os resultados obtidos foram muito diferentes.

Na literatura podem-se encontrar diversos métodos para avaliar como a hidrólise transcorreu. Dentre eles há a difração de raios X, que pode ser usado para a diferenciação entre amidos nativos e também para a detecção de mudanças na cristalinidade provocada por tratamento físico ou químico no amido, mostrando padrões de difração dos tipos A, B e C (SHARIFFA et al. 2009; NEBESNY et al., 2004; MARTÍN; LÓPEZ, 2009; MA et al., 2006). Um dos usos da análise DSC é para avaliar se o complexo amilose-lipídio foi decomposto (NEBESNY et al., 2002).

A extensão da hidrólise também pode ser detectada por TLC (LI et al., 2007), utilizando sílica gel 60 e os açúcares padrões. O padrão de manchas, pode concluir se o produto hidrolisado contém ou não o carboidrato (ABSAR et al., 2009). Os açúcares liberados durante o processo podem ser avaliados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), o qual baseia-se na redução, em meio alcalino, do 3,5-dinitrosalicilato (coloração amarela). O produto formado é estável, com coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) na proporção estequiométrica e máxima absorção da luz visível no comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959). Ou pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando detector e coluna específicos (ERDEI et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

Existem vários métodos para quantificação de amido. As principais etapas são a gelatinização, a solubilização e a hidrólise. Os açúcares liberados são detectados por métodos colorimétricos. Dentre os métodos químicos de dosagem de amido disponíveis, o de Mccready et al., (1950) é baseado na solubilização do amido por ácido perclórico (PURCHER et al., 1948) ou ácido sulfúrico (STEINER; GUTHRIE 1944) e subsequente quantificação por antrona (JERMYN, 1956) ou por fenol seguido de ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O hidróxido de sódio (NaOH) (ÂREAS; LAJOLO, 1980) e o dimetil sulfóxido (DMSO) podem ser utilizados para extração de amido (CARPITA; KANABUS, 1987).

Todos estes métodos possuem alguma limitação, como superestimação do teor de amido, contaminação por outras enzimas, como amiloglicosidase, que podem apresentar presença por celulasas e outras glicosidasas que liberam monossacarídeos de polímeros da parede celular (AMARAL, 2007). A escolha do método será dependente da precisão esperada, da finalidade e dos recursos disponíveis.

2.4. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica consiste em um processo biológico, no qual carboidratos são transformados em etanol e gás carbônico através do metabolismo anaeróbico, no entanto, outras substâncias, como o glicerol e o ácido acético são

produzidos em quantidades menores. O substrato usado na fermentação alcoólica é altamente variável e pode ser constituído por produtos de açúcar, como caldo de cana, beterraba, mel, melaço e frutas ou materiais amiláceas, como grãos de amido, raízes, tubérculos e outros (JONES et al., 1981; SOUZA; QUEIROZ, 1995).

As leveduras são microorganismos importantes na obtenção do álcool por via fermentativa, e economicamente são os agentes largamente utilizados. A levedura *Sacharomyces cerevisiae*, normalmente na forma unicelular (LIMA et al., 2001), apresentam alta eficiência fermentativa (AMORIM, 2005).

Vários microorganismos, incluindo a *Saccharomyces cerevisiae*, não são capazes de degradar o amido, uma vez que não produzem enzimas que decompõem o amido, por isso, é necessário a adição de enzimas específicas, a fim de utilizar esta fonte de carbono (ALTINTAS et al., 2003). Esta levedura é fortemente inclinada a realizar fermentação alcoólica. Mesmo sob condições totalmente aeróbias, o etanol é produzido, quando os açúcares estão presentes em excesso (VAN DIJKEN et al., 1993).

A conversão do açúcar em etanol e gás carbônico envolve 12 reações sequenciadas, catalisadas por enzimas específicas. Tais enzimas encontram-se confinadas no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região que ocorre o processo (LIMA et al., 2001).

As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C (LIMA et al., 2001). O rendimento é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20 °C), entretanto demora para obter a produção máxima. Com o birreator com temperatura entre 25 e 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas acima de 35°C a viabilidade celular decresce (TORIJA et al., 2003).

Quanto ao pH, as fermentações se desenvolvem em uma ampla faixa de valores, sendo adequada entre 4 e 5. Nos mostos industriais os valores geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA et al., 2001).

No Brasil o etanol, em escala industrial, é obtido a partir da cana-de-açúcar que possui seus carboidratos armazenados na forma de sacarose e após um aquecimento térmico são diretamente fermentados por leveduras. Nos EUA, o milho

é a fonte utilizada para a fermentação, porém esta matéria-prima necessita de um tratamento que converta o amido em açúcar livre, tornando possível a utilização no metabolismo da levedura mais usual.

2.5. Normatização do Etanol Combustível

Nos últimos anos o mercado americano de etanol expandiu-se significativamente, em função da substituição do éter metil-terc-butil (MTBE) pelo etanol para melhorar a octagem da gasolina (NEVES; CONEJERO, 2007). Nos Estados Unidos, o combustível para transporte mais vendido é fabricado com as especificações ASTM, que é uma organização que estabelece e mantém particularizações do combustível de qualidade (EPA, 2010b).

Cada país possui normas próprias para o etanol utilizado como combustível, sendo que há as particularidades de cada um. Por exemplo, o calor de vaporização do etanol é mais do que o dobro do valor da gasolina e devido a isto, até que o motor atinja a temperatura operacional, não vaporiza rapidamente a baixas temperaturas. Para garantir a partida do motor em todas as regiões dos Estados Unidos, o etanol é misturado com pelo menos 15% de hidrocarboneto, que por sua vez é mais volátil que o etanol, chamado E85, enquanto o etanol utilizado na mistura com gasolina para uso como combustível em motores automotivos é "desnaturado", adicionando-se 2% de hidrocarbonetos, como gasolina natural. A gasolina natural é um subproduto da produção de gás natural e possui um teor de octanagem menor do que a gasolina comercial convencional (EPA, 2010b).

No Brasil, onde as baixas temperaturas não são frequentemente encontradas, é mais prático o uso do etanol (100%) puro. No entanto, mesmo no Brasil, a maioria dos veículos *flex-fuels*, são equipados com um pequeno reservatório de gasolina que pode ser usado em temperatura fria (menor do que 10°C). Para volumes idênticos, o etanol contém aproximadamente 30% menos energia do que a gasolina, dependendo da formulação da gasolina. Como resultado, a economia de combustível de veículos E85 pode vir a ser reduzida em cerca de 30%, dependendo da formulação da gasolina e do veículo (EPA, 2010b).

No Brasil o etanol anidro combustível comercializado até 30 de abril de 2011 seguia ao Regulamento Técnico Nº 6/2011, anexo da Resolução nº 18, de 24 de março de 2011 (ANP, 2011b), onde determina que deveria ser incolor, a massa específica (20°C, kg/m³) deveria ser anotada, o teor de etanol (% vol.) mínimo seria de 92,1%, o teor de metanol (% vol.) máximo seria de 0,5%, o teor de água (% vol.) máximo seria de 1%, a acidez máxima seria de 56 mg de ác. acético/L, a condutividade elétrica máxima de 500 µS/m e o teor de hidrocarbonetos máximo 5 % vol.

Após 30 de abril de 2011, todo o etanol anidro comercializado no território nacional atende exclusivamente a especificação estabelecida no Regulamento Técnico da ANP nº 3/2011, parte integrante da Resolução ANP Nº 7/2011 (ANP, 2011a). Os demais dispositivos previstos ficaram mantidos, relativos às obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidos pelos diversos agentes que comercializam o etanol combustível em todo o território nacional, bem como a especificação do etanol hidratado combustível (ANP, 2011a). Na Tabela 1 estão contidos os valores das características consideradas neste regulamento e os valores estabelecidos pela legislação dos Estados Unidos quanto ao Etanol desnaturado para mistura com gasolina e Etanol Combustível (E85).

Tabela 1: Especificações do álcool etílico anidro combustível (EAC) e do álcool etílico hidratado combustível (EHC), utilizados no Brasil (ANP, 2011a); do Etanol desnaturado para mistura com gasolina e etanol Combustível (E85), utilizados nos EUA (EPA, 2010b)

| CARACTERÍSTICA | UNIDADE | LIMITE | | | |
|--|-------------------|------------------------------------|---------------|---|-----------------------|
| | | EAC Brasil | EHC Brasil | Etanol Desnaturado - EUA | E85 - EUA |
| Aspecto | - | Límpido e Isento de Impurezas (LI) | | visivelmente livre de contaminantes suspensos ou precipitados | |
| Cor | - | Laranja, com corante | Sem corante | Claro e brilhante | |
| Acidez total, máx | mg/L | 30 | | 56 | 50 |
| Condutividade elétrica, máx. | µS/m | 350 | | - | - |
| Massa específica a 20°C | kg/m ³ | 791,5 máx | 807,6 a 811,0 | - | - |
| Teor alcoólico | % volume | 99,6 mín. | 95,1 a 96,0 | - | 68, 74 e 79* |
| | % massa | 99,3 mín. | 92,5 a 93,8 | | |
| pH | - | - | 6,0 a 8,0 | 6.9–9.0 | - |
| Teor de etanol, mín. | % volume | 98,0 | 94,5 | 92,1 | - |
| Teor de água, máx. | % volume | 0,4 | 4,9 | 1,0 | |
| Teor de metanol, máx. | % volume | 1 | | 0,5 | |
| Resíduo por evaporação, máx. | mg/100 mL | 5 | | - | - |
| Goma Lavada – solvente | mg/100 mL | 5 | | | |
| Teor de hidrocarbonetos, máx. | % volume | 3 | | - | 17-21, 17-26 e 17-30* |
| Teor de cloreto, máx | mg/kg | 1 | | - | 2 |
| Teor de sulfato, máx. | mg/kg | 4 | | 4 | - |
| Teor de ferro, máx. | mg/kg | 5 | | - | - |
| Teor de sódio, máx. | mg/kg | 2 | | - | - |
| Teor de cobre, máx | mg/kg | 0,07 | - | - | 0,07 |
| Teor de cloretos inorgânicos, máx | mg/kg | - | - | 1 | 32 (mg/L) |
| Desnaturante, min máx | % volume | - | - | 1,96 5,0 | - |
| Enxofre, ppm, máx. | - | - | - | 30 | 210, 260 e 300* |
| Álcoois alifáticos superiores (C3-C8), máx | % volume | - | - | - | 2 |
| Goma Lavada, máx. | mg/100ml | - | - | - | 20 |
| Chumbo (máx.) | mg/L | - | - | - | 2,6 e 3,9* |
| Fósforo (máx.) | mg/L | - | - | - | 0,2, 0,3 e 0,4* |

* De acordo com a Classe de Volatilidade determinada pela ASTM

De acordo com a Tabela 1 pode-se verificar que existem algumas diferenças nos parâmetros considerados pelos dois países. O limite da Acidez total máxima, em miligramas de ácido acético por litro de etanol, é de 30 no Brasil, para ambos os tipos de alcoóis (EAC e EHC), enquanto nos EUA o limite é de 50 para o E85. O teor alcoólico do E85 é bem menor do que do etanol hidratado combustível (EHC), pois possui 15% de hidrocarbonetos e isto também faz com que este combustível possua teor de hidrocarbonetos bastante superior. Enquanto o teor de água no etanol utilizado nos EUA é o dobro do utilizado no Brasil, o metanol já é a metade permitida na legislação brasileira. Outra diferença é quanto às especificações consideradas, por exemplo, a condutividade elétrica, o teor de sódio, o teor de ferro, o resíduo por evaporação e a massa específica constam na regulamentação brasileira, mas não na dos EUA. Enquanto os EUA avaliam o teor de cloretos inorgânicos, enxofre, alcoóis alifáticos superiores, goma lavada, teor de desnaturante, chumbo e fósforo e parâmetros que o Brasil não considera.

A não padronização da qualidade do etanol pode originar problemas como a dificuldade no armazenamento, logística de distribuição, possibilidade de contaminação (mistura) do produto e a dificuldade de tornar o etanol um produto comercializado de acordo com os valores internacionais, pois não haverá um padrão de referência para negociação, descaracterizando o produto como uma *commodity* (SILVA, 2008). Além das especificações técnicas, uma certificação, atendendo padrões internacionais, deverá contemplar o tripé da sustentabilidade, atendendo aos aspectos social, ambiental e econômico (ESPÍNDOLA, 2009).

Em virtude disto, no Brasil, o Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis - PMQC foi instituído, pela ANP, visando atender ao disposto no artigo 8º da Lei 9.478/1997, em particular o que trata da garantia de qualidade e do suprimento de combustíveis ao mercado nacional. Os índices de não conformidades do etanol no Brasil diminuíram ao longo dos anos, em 2005 era de 6,5%, sendo 3,8% em 2006, 3,1% em 2007, 2,3% em 2008, 1,7% em 2009, aumentando para 2,2% em 2010 e caindo para 1,1% em agosto deste ano. Destas inconformidades 49% eram a respeito da massa específica e teor alcoólico, 17,6% se referia a condutividade e

5,9% ao pH (ANP, 2011d). A massa específica e o teor alcoólico controlam a pureza do produto e o teor de hidratação que correspondem à maioria das irregularidades, enquanto a condutividade e o pH restringem a possibilidade de corrosão do motor causada pelo combustível.

Na Tabela 2 há outras especificações para o etanol e para o E85, determinadas nos EUA.

Tabela 2: Especificações do etanol combustível e do E85 utilizadas nos EUA (EPA, 2010b)

| Propriedades | Etanol | E85 |
|---|----------------------------------|--|
| Fórmula química | C ₂ H ₅ OH | C ₄ to C ₁₂ Hidrocarbonetos e hidrocarbonetos oxigenados |
| Constituintes principais (% em peso) | 52 C, 13 H, 35 O | 57 C, 13 H, 30 O |
| Octano (R+M)/2 | 98-100 | 95-97 |
| Calorífico inferior (unidade térmica britânica (BTU) por galão) | 76,300 | 83,600- 89,400 |
| Galão de gasolina Equivalência (v / v de gasolina) | 1.5 | 1.3-1.4 |
| Milhas por Galão Comparado à Gasolina | 67% | 73% |
| Pressão de Vapor Reid (psi) | 2.3 | 7-12 |
| Ponto de ignição do combustível no ar (%) | 3-19 | * |
| Temperatura (aprox.) (F) | 850 | * |
| Gravidade específica (60/65°F) | 0.794 | 0.78 |
| Arranque em tempo frio | fraco | razoável** |
| Razão Ar-Combustível (em peso) | 9 | 10 |
| Razão H/C | 3.0 | 2.75-2.95 |

* Depende das propriedades dos hidrocarbonetos componentes da mistura. **Depende do combustível a ser misturado com as suas especificações.

Nos EUA, tanto no etanol utilizado para misturar com a gasolina quanto o no E85 não são adicionados corante. Enquanto no Brasil, ainda no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2010 (ANP, 2010), a cor do EAC deveria ser incolor, o Regulamento Técnico ANP nº 6 de 2011 (ANP, 2011b) estabeleceu que o teor de corante a ser adicionado fosse obrigatoriamente de 15 mg/L. Segundo a Resolução ANP nº 7, de 9 de fevereiro 2011 (ANP, 2011a) corante é produto registrado na ANP e fornecido por fornecedor de corante, que confere coloração laranja ao etanol anidro, combustível com intuito de diferenciá-lo do etanol hidratado combustível.

Na Tabela 3, está descrita a especificação do corante a ser adicionado ao etanol anidro combustível.

Tabela 3: Especificações do corante a ser adicionado ao etanol anidro combustível brasileiro, contidas no Regulamento Técnico ANP nº 3/2011 (ANP, 2011a)

| CARACTERÍSTICA | ESPECIFICAÇÃO | MÉTODO |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Estado físico | Líquido | visual |
| Família química - | Solvent Red 19 ou Red 164 | - |
| Color index | Solvent Yellow 174 ou Yellow 175 | - |
| Cor | Laranja | visual |
| Absorbância a 420 nm | 0,150 a 0,190 | EAC contendo 15 mg/L |
| Absorbância a 530 nm | 0,100 a 0,135 | EAC contendo 15 mg/L |
| Solubilidade | Solúvel em etanol anidro combustível | Descrita pela ANP |

A maioria do combustível utilizado no Brasil ou é uma mistura de etanol 20% (ANP, 2011c) ou etanol hidratado constituída por etanol 93% e 7% de água, e a maioria dos veículos vendidos atualmente no Brasil são do tipo flex-fuel. Estes são diferentes dos vendidos nos EUA. Os flex-fuels brasileiros são fabricados com padrões de segurança e de emissão diferentes e não poderiam ser vendidos nos Estados Unidos sem diversas alterações e certificação, para atender às exigências do país. Os motores e sistemas de combustível são projetados para operar em 20% de etanol anidro, 100% etanol hidratado, ou qualquer combinação desses combustíveis (EPA, 2010b).

Apesar de o Brasil ter iniciado as suas experiências com etanol em 1925, e começar a adicionar álcool à gasolina importada a partir de 1931, só em 2005 a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis estabeleceu as especificações para comercialização do Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC) e do Álcool Etílico Hidratado Combustível (AEHC) em todo o território nacional e definiu as obrigações dos agentes econômicos sobre o controle de qualidade do produto (ANP, 2005), sendo revogado pela Resolução ANP nº 7, com efeitos a partir de fevereiro de 2011 (ANP, 2011a).

2.6. Metodologia de superfície de resposta

A técnica convencional para a otimização de um processo multivariável geralmente define um elemento de cada vez. É necessário realizar uma série de experimentos e não revela os efeitos alternativos entre os componentes. O delineamento composto central consta de uma parte fatorial, uma parte axial e pontos centrais. A Metodologia de superfície de resposta (RSM) é um método comumente utilizado para avaliar as condições de fermentação ideais e também uma técnica estatística eficiente para a otimização de múltiplas variáveis com o número mínimo de experimentos. Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta (PEREIRA et al., 2010).

Este delineamento apresenta também dois níveis de variáveis axiais que são codificadas como $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor depende do número fatorial ($F = 2K$) do delineamento e do número de variáveis independentes ($K = 2$), sendo o valor definido pela equação (TORRES, 2009):

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^K)^{1/4} = 1,4142$$

Para análise dos resultados experimentais, a metodologia descreve o comportamento de um sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes e a variável dependente ou resposta. A resposta é uma função dos níveis nos quais estes fatores foram combinados e definidos conforme Box e Draper (1987). Através de análise de regressão, um polinômio de segunda ordem com as variáveis explicativas pode ser ajustado para cada resposta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matérias-primas

Para este experimento foram utilizadas as seguintes matérias-primas: batata-doce industrial, cultivar Duda, catalogada como BDI 112, cedida pelo Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis (LASPER), localizado na Estação Experimental/UFT; mandioca brava, variedade popularmente chamada de Jabuti, adquirida de agricultores familiares da região do Bico do Papagaio-TO e milho, em grãos, triturado, da variedade Ag-1051 adquirido no comércio local, município de Palmas.

3.1.1. Milho

O milho em grãos e triturado foi desidratado em estufa com circulação forçada de ar (80°C / 48 h). Em seguida triturado em partículas menores e padronizado em peneira de 28 mesh e armazenado sob refrigeração entre 7 e 10°C, de onde foram retiradas amostras para posterior análise.

3.1.2. Batata-doce

Depois da colheita e seleção dos tubérculos sadios, a batata-doce foi lavada com água corrente, seccionada em pedaços menores e triturada duas vezes (Nogueira DPM 2000; peneira de 3 mm; 20 Martelos e 2 Facas). Pesou-se em quantidades determinadas, colocando-as em sacos plásticos de polietileno e congeladas a -18°C, até o momento da secagem. Desidratou-se em estufa de circulação forçada de ar (80°C / 48 h) e em seguida padronizou-se em peneira de 28 mesh e armazenou-se sob refrigeração (~10°C). Amostras foram retiradas para procedência das análises.

3.1.3. Mandioca

Após recebimento, separou-se as raízes sadias e procedeu-se a lavagem, corte e trituração por duas vezes (Nogueira DPM 2000; peneira de 3 mm; 20

Martelos e 2 Facas). A massa pesada foi colocada em sacos plásticos de polietileno e congelada a -18°C, até o momento de sua utilização. Após descongelamento as amostras foram desidratadas em estufa de circulação forçada de ar (80°C/48 h), em seguida padronizadas em peneira de 28 mesh e armazenadas sob refrigeração até posterior análise.

3.2. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica das substâncias (glicose, maltose, frutose e etanol) foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10 Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 40°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 30 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-10A). Uma alíquota de 20,0 µl da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna de fase reversa da marca Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal. Padrões, de cada substância, foram utilizados para construção da curva de calibração, que forneceu uma equação, utilizada para calcular a concentração.

3.2.1. Quantificação dos açúcares e do etanol por CLAE

A Tabela 4 mostra as equações que representam o ajuste do modelo de regressão linear aos dados de área sob os picos ("x") e a concentração de açúcares ("y"), verificando-se elevados coeficientes de correlação.

Tabela 4: Parâmetros utilizados para cálculos das curvas analíticas, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizadas na avaliação dos hidrolisados ou dos fermentados obtidos nos Ensaios 1, 2 e 3.

| Composto | Tempo de retenção (min) | Concentração (µg/ml)* | Equação da reta | R ² | Nº Equação |
|---------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------|------------|
| Glicose | 10,26 | 10 - 1000 | $y = 301,9x - 128,8$ | 0,992 | (1) |
| Maltose | 8,59 | 24 - 1000 | $y = 250,3x - 3862$ | 0,999 | (2) |
| Frutose | 11,02 | 11 - 1000 | $y = 282x - 4495$ | 0,999 | (3) |
| Etanol(µl/ml) | 22,14 | 0,089 - 2,5 | $y = 93850x - 4169$ | 0,999 | (4) |

Onde, "x" representa a área dos picos no cromatograma obtido por CLAE e "y" representa a concentração de cada analito. *Exceto a concentração de etanol, que esta expressa em µl/ml. . Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C.

3.3. Análises de composição

As matérias-primas foram submetidas a análises de determinação de matéria seca, por secagem em estufa a 105°C, por 24 horas, monitorando-se em balança analítica até peso constante, segundo IAL (2008).

3.3.1. Açúcares solúveis

Amostras de cada uma das matérias-primas foram retiradas da refrigeração e colocadas novamente em estufa (105°C/24h). Após resfriamento em dessecador, três alíquotas de 0,5g foram acuradamente pesadas, às quais foram adicionadas 10 mL de etanol 80%. Essas misturas foram homogeneizadas durante 2 min, com a finalidade de se extraírem os açúcares solúveis. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2263xg durante 10 min. O sobrenadante foi retirado e colocado em balão volumétrico, onde completou-se o volume para 10 ml com água ultrapura (destilada e deionizada) e filtrou-se em papel filtro de 0,45 µm de porosidade (membrana HV em PVDF, Millipore) e procedeu-se a análise quantitativa por CLAE. Os resultados foram expressos em g/100 de massa seca.

3.3.2. Glicose Total e Amido

Para a quantificação dos teores dos açúcares totais presentes nas matérias-primas, foi utilizado o método da hidrólise enzimática, conforme descrito por Torres (2009), com adaptações, que consiste em se pesar acuradamente em um erlenmeyer de 125 ml, 200 mg da amostra finamente moída (que passou por malha

de 0,17 mm), previamente seca e resfriada. Acrescentou-se 42 mL de água destilada. Para a hidrólise inicial, foram adicionados 100 µL de solução comercial de α-amilase (Liquozyme® SC), inclusive na prova em branco. As amostras, em quatro repetições, foram colocadas sob agitação à temperatura de 90°C por 2 h e 30 min. Decorrido este período, ajustou-se a temperatura para 55°C, em seguida foram adicionados 2,0 mL de solução tampão acetato de sódio (4M, pH 4,8) e 100 µL de solução de glicoamilase (Spirizyme® Fuel). As amostras, sob agitação, permaneceram por 2 h a 55 °C. Após esse procedimento, realizou-se teste qualitativo, com lugol, para verificar a completa dextrinização do amido. O hidrolisado foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume água ultrapura (destilada e deionizada), até o menisco. 15 ml foram retirados e centrifugados a 2263xg por 10 min. Filtrou-se o sobrenadante em papel filtro de 0,45 µm de porosidade (membrana HV em PVDF, Millipore) e procedeu-se a análise em CLAE, conforme descrito em 4.2. O cálculo do teor de amido se deu pela conversão da porcentagem de glicose após hidrólise; descontando-se o percentual de glicose calculado nos açúcares iniciais, determinado pelo fator 0,9 conforme Somogy (1945). Os dados foram tomados em porcentagem de massa úmida.

$$\% \text{ Amido} = (\% \text{ Glicose total} - \text{Glicose inicial.}) \times 0,9 \quad (5)$$

3.4.Primeiro ensaio: Efeito das concentrações das enzimas α-amilase e glicoamilase sobre a hidrólise da mistura amilácea

O primeiro ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito das concentrações das enzimas α-amilase (Liquozyme® SC) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel), sobre o teor de glicose produzida.

3.4.1. Delineamento experimental

Para a realização deste ensaio foi utilizado o delineamento “central composto rotacional” para dois fatores, segundo Barros Neto et al. (2007), com um total de 13 tratamentos.

Os parâmetros do processo, estabelecidos como variáveis independentes, foram estudados em 3 níveis, codificados como -1, 0, +1 (Tabela 5). Os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos dentro das possibilidades operacionais do processo de hidrólise, baseados também em dados de literatura e ensaios preliminares, que foram realizados exaustivamente.

Os parâmetros fixos do processo foram: as temperaturas e tempo de ação das enzimas no reator na etapa de liquefação (90°C/1,5 h), a temperatura na sacarificação (60°C) e o tempo de reação 2 horas.

Tabela 5: Parâmetros variáveis do processo utilizados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre o rendimento de açúcares redutores na hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Axiais | Níveis | | Fatores ou variáveis independentes | |
|------------|-------------|--|------------------------------------|-------------------------------|
| | Codificados | | α -amilase (ml/Kg amido) | Glicoamilase (ml/Kg amido) |
| - α | -1,4142 | | 0,36 | 0,67 |
| | -1 | | 1,10 | 2,07 |
| | 0 | | 2,89 | 5,43 |
| | +1 | | 4,68 | 8,79 |
| + α | +1,4142 | | 5,43 | 10,18 |

• $\pm | \alpha | = 1,4142$

A Tabela 6 mostra o delineamento experimental com os níveis codificados e reais das variáveis independentes, nos diferentes tratamentos.

Tabela 6: Delineamento experimental utilizado na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre o rendimento de açúcares redutores na hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Corrida | Codificado | | Real | |
|---------|----------------|----------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | α -amilase (ml/Kg amido) | glicoamilase (ml/Kg amido) |
| 1 | -1 | -1 | 1,10 | 2,07 |
| 2 | 1 | -1 | 4,68 | 2,07 |
| 3 | -1 | 1 | 1,10 | 8,79 |
| 4 | 1 | 1 | 4,68 | 8,79 |
| 5 | - α | 0 | 0,36 | 5,43 |
| 6 | + α | 0 | 5,43 | 5,43 |
| 7 | 0 | - α | 2,89 | 0,67 |
| 8 | 0 | + α | 2,89 | 10,18 |
| 9 | 0 | 0 | 2,89 | 2,43 |
| 10 | 0 | 0 | 2,89 | 5,43 |
| 11 | 0 | 0 | 2,89 | 5,43 |
| 12 | 0 | 0 | 2,89 | 5,43 |
| 13 | 0 | 0 | 2,89 | 5,43 |

• $\pm | \alpha | = 1,4142$; X₁, X₂ = variáveis dependentes: concentração de α -amilase (Liquozyme® SC) e concentração de glicoamilase (Spirizyme® Fuel), respectivamente.

3.4.2. Processo de Hidrólise

Foram preparadas suspensões de batata doce, mandioca e milho (BDI+Mi+Ma) em água na concentração de 3,63% de amido total. Pesou-se, em cada erlenmeyer de 250 ml, exatamente 1,65g de BDI, 1,68g de Ma e 2,19g de Mi, e foram adicionados 84 ml de água destilada, de forma que cada matéria-prima contribuísse com 1/3 do amido total. As suspensões, pH 5,4, foram submetidas ao processo de hidrólise sob agitação e temperatura controlada. Na liquefação, adicionou-se a dose de enzima α -amilase estipulada para cada tratamento, conforme tabela 6, aguardou-se atingir a temperatura de processo, e a suspensão foi mantida por 90 minutos a 90°C ($\pm 0,1$).

Na etapa de sacarificação, corrigiu-se o pH, colocando-se 2 ml de tampão acetato de sódio (4M, pH 4,8). Em seguida adicionou-se glicoamilase (Spirizyme® Fuel), aguardando-se a reação por duas horas, a 60°C ($\pm 0,1$). Ambas as etapas em banho-maria (Novatecnica, modelo NT 265).

3.4.3. Análises dos açúcares redutores e do perfil sacarídeo dos hidrolisados

Para uma investigação inicial, foi analisado quanto aos açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma curva padrão de glicose, Tabela 7, foi utilizada para calcular a concentração. Estes dados foram utilizados nas análises estatísticas e construção do modelo estatístico e dos gráficos.

Tabela 7: Parâmetros utilizados nos cálculos da concentração de açúcares redutores (AR), nos hidrolisados da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho), na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1), utilizando a curva analítica, obtida pelo método de DNS (Miller, 1959)

| Substância | Concentração (mg/ml)* | Equação da reta | R ² | Nº Equação |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------------|------------|
| Glicose | 0,010 - 0,583 | $y = 3,4333x - 0,024$ | 0,994 | (6) |

Onde, "x" representa a absorbância obtida a 540 nm em espectrofotômetro e "y" representa a concentração do analito.

Após o processo de hidrólise, transferiu-se, quantitativamente, todo o hidrolisado para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume. Deste retirou-se 5 ml, que foram colocados em balão volumétrico de 250 ml, completando novamente o volume, com água ultrapura (destilada e deionizada). Destas amostras foram retirados 15 ml, que foram centrifugados (2263xg/10 min). Os sobrenadantes foram utilizados nas análises.

O rendimento de processo foi calculado dividindo-se o valor obtido (experimental) nas análises pelo valor teórico obtido através das reações de obtenção de glicose a partir do amido, considerando-se o volume adquirido de hidrolisado e as diluições em cada tratamento.

Com o intuito de identificar qualitativamente os sacarídeos presentes, realizou-se a análise em cromatografia líquida de alta eficiência. Filtrou-se amostra em papel filtro de 0,45 μ m de porosidade (membrana HV em PVDF, Millipore) e realizou-se análise por CLAE.

3.4.4. Análise dos dados

Os resultados obtidos quanto aos teores de açúcares redutores, no delineamento experimental, foram avaliados por meio da Metodologia de Superfície

de Resposta e Análise de Variância (ANOVA). Os gráficos de superfície de resposta, de curva de níveis, de Pareto e o modelo matemático foram obtidos através do programa *Statistica 10 trial*¹. A significância do modelo foi testada pela ANOVA, adotando-se o nível de significância de 5%.

3.4.5. Validação do modelo

Com base nos resultados indicados pela análise estatística, gráficos de superfície de resposta e de curva de níveis, realizou-se a hidrólise nas condições indicadas como ideais, em três repetições, verificando o rendimento de sacarídeos, por CLAE.

3.5. Segundo ensaio: Efeito do tempo de fermentação e da concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de fermentação e da concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sobre os teores de etanol.

3.5.1. Delineamento experimental

O processo de fermentação seguiu o delineamento central composto rotacional para dois fatores, quais sejam: concentração de fermento (%) e tempo de fermentação (h), em dois níveis de variáveis axiais que são codificados como $-\alpha$ e $+\alpha$.

Os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos com base em resultados preliminares (Tabela 8).

¹ Disponível no site: < <http://www.statsoft.com/support/free-statistica-10-trial/> >

Tabela 8: Parâmetros variáveis utilizados na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Variáveis | | Níveis | | | | |
|----------------|----------------------------------|------------|------|-----|------|------------|
| Codificado | Real | - α | -1 | 0 | +1 | + α |
| X ₃ | Tempo de fermentação (horas) | 17 | 20 | 24 | 28 | 31 |
| X ₄ | Concentração de levedura (% p/v) | 0,24 | 0,75 | 1,5 | 2,25 | 2,76 |

$\pm |\alpha| = 1,4142$. X₃, X₄ = variáveis dependentes: tempo de fermentação (h) e concentração de levedura (%p/p), respectivamente

A Tabela 9 mostra o delineamento experimental com os níveis codificados e reais das variáveis independentes, nos diferentes tratamentos.

Tabela 9: Delineamento experimental utilizado na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Ensaio | Codificado | | | Real |
|--------|----------------|----------------|-----------|------------------------|
| | X ₃ | X ₄ | Tempo (h) | Conc. levedura (% p/p) |
| 1 | 0 | - α | 24 | 0,24 |
| 2 | 0 | 0 | 24 | 1,50 |
| 3 | 0 | 0 | 24 | 1,50 |
| 4 | 1 | 1 | 28 | 2,25 |
| 5 | 0 | 0 | 24 | 1,50 |
| 6 | -1 | 1 | 20 | 2,25 |
| 7 | + α | 0 | 31 | 1,50 |
| 8 | 1 | -1 | 28 | 0,75 |
| 9 | 0 | + α | 24 | 2,76 |
| 10 | -1 | -1 | 20 | 0,75 |
| 11 | - α | 0 | 17 | 1,50 |

• $\pm |\alpha| = 1,4142$; X₃, X₄ = variáveis dependentes: tempo de fermentação (h) e concentração de levedura (%p/p), respectivamente

3.5.2. Preparo do mosto

Coma interpretação dos resultados da etapa de hidrólise foi possível estabelecer uma condição considerada ótima. A hidrólise foi realizada conforme item 4.4.2. Adicionou-se o fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*), nas concentrações estabelecidas (% de massa do fermento em relação ao volume de água do mosto, 84 ml). Em seguida os erlenmeyers foram colocados em shaker rotativo com temperatura e velocidade de agitação controlados, 32°C e 80

rpm, respectivamente. No processo fermentativo, cada frasco permaneceu na incubadora pelo tempo estabelecido no delineamento experimental descrito na Tabela 9.

3.5.3. Análises dos fermentados

Após o período determinado, os fermentados foram transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 250 ml e completou-se o volume com água ultrapura (destilada e deionizada). Do balão retirou-se 15 ml, que foram centrifugados (2263xg/10 min) para separação do fermentado. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em membrana com 0,45 µm de porosidade (membrana HV em PVDF, MilliPore). As amostras foram diluídas, para as concentrações se adaptarem à curva de calibração, 20 vezes para os tratamentos 1,3 e 7 e 10 vezes para o restante, utilizando água ultrapura (destilada e deionizada). Procederam-se as análises cromatográficas com o objetivo de se determinar a concentração de etanol presente no vinho. A concentração foi calculada por meio de equação gerada pela curva-padrão relativa ao analito de interesse.

3.5.4. Análise dos dados

Para análise dos resultados experimentais, foi seguida a mesma metodologia do primeiro ensaio no qual estão combinadas as variáveis independentes e a variável dependente ou resposta (Tabela 9), utilizando-se o programa *Statistica 10 trial*².

3.5.5. Validação do modelo

Com base nos resultados indicados pela análise estatística, gráficos de superfície de resposta e de curva de níveis, realizou-se a fermentação nas condições indicadas como ideais, em três repetições, verificando o rendimento de etanol e açúcares, por CLAE.

² Disponível no site: < <http://www.statsoft.com/support/free-statistica-10-trial/> >

3.6. Terceiro ensaio

Este ensaio teve por objetivo avaliar a eficiência da fermentação das três matérias-primas (Batata-doce industrial, mandioca e milho) em diferentes combinações, utilizando-se as melhores condições encontradas no 1° e no 2° ensaios.

A figura 1 ilustra o fluxograma do experimento.

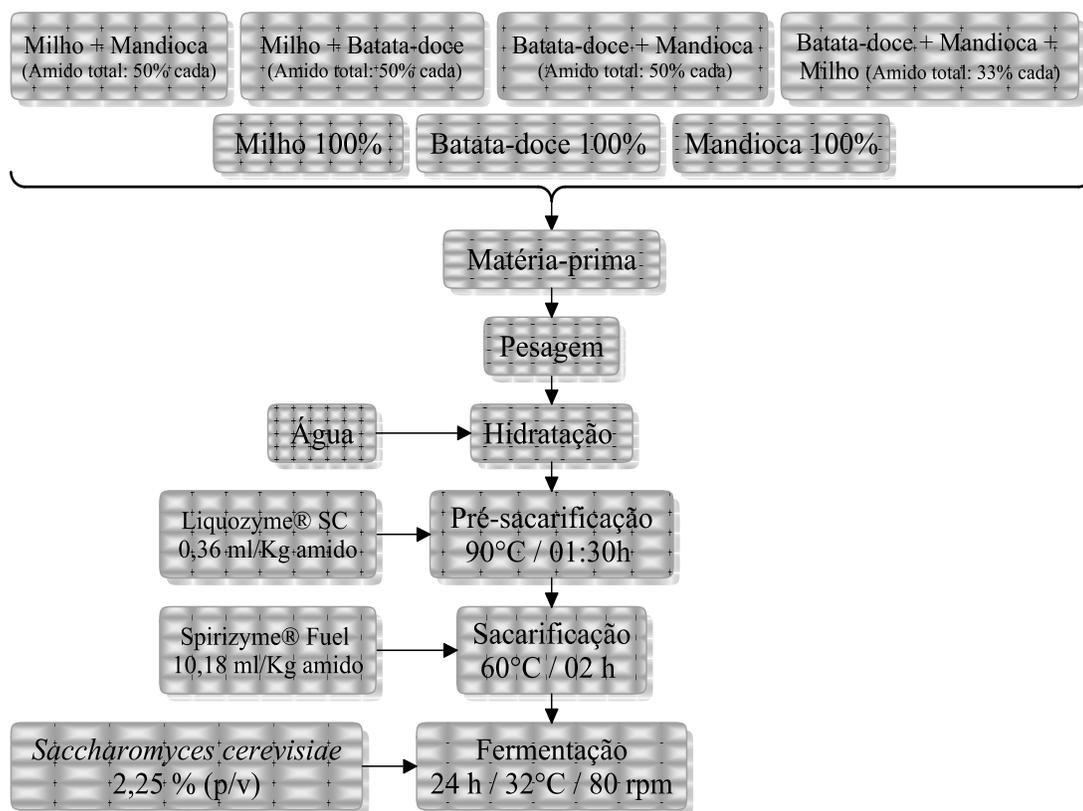


Figura 1: Fluxograma de obtenção de etanol utilizando diferentes combinações das matérias-primas, em função da quantidade de amido. Cada batelada foi realizada em triplicata.

3.6.1. Preparo do hidrolisado e Fermentação

Foram preparadas suspensões de batata doce, mandioca e milho (BDI, MI e MA), em diferentes associações, na concentração de 3,63% de amido total. As massas utilizadas, conforme a tabela 10, foram diluídas em 84 ml de água destilada.

Tabela 10: Delineamento experimental utilizado na avaliação da fermentação da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho) em diferentes combinações, utilizando as melhores condições determinadas nas etapas de hidrólise (Ensaio 1) e de fermentação (Ensaio 2)

| Ensaio | Combinação | Amido total | Massa (g) | | |
|--------|---------------|-------------|-----------|------|------|
| | | | BDI | Ma | Mi |
| 1 | BDI | 100% | 4,80 | - | - |
| 2 | Ma | 100% | - | 5,20 | - |
| 3 | Mi | 100% | - | - | 6,52 |
| 4 | Ma + Mi | 50% cada | - | 2,59 | 3,26 |
| 5 | BDI + Mi | 50% cada | 2,39 | - | 3,26 |
| 6 | BDI + Ma | 50% cada | 2,39 | 2,59 | - |
| 7 | Mi + Ma + BDI | 33% cada | 1,65 | 1,67 | 2,19 |

BDI, MI e MA correspondem a batata-doce industrial, milho e mandioca, respectivamente.

As suspensões foram submetidas ao processo de hidrólise, em frascos com capacidade para 250 ml que foram colocados em banho-maria de temperatura controlada e agitação mecânica.

Na liquefação, adicionou-se a dose de enzima α -amilase estipulada no Ensaio 1, aguardou-se atingir a temperatura de processo, e a suspensão foi mantida por 90 minutos à 90°C. Na etapa de sacarificação foi realizada a correção do pH, colocando-se 2 ml de tampão acetato de sódio (4M, pH 4,8), e a adição da glicoamilase (Spirizyme® Fuel), reagindo por duas horas a 60°C. Ambas as etapas em banho-maria (Novatecnica, modelo NT 265).

Decorrido o período de hidrólise os frascos foram resfriados a temperatura ambiente e adicionou-se a quantidade de fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*), estabelecida como ideal (Ensaio 2). Os reatores foram colocados em shaker rotativo (32°C/80 rpm) e deixados o período que apresentou o maior rendimento, conforme análise estatística do 2º ensaio.

3.6.2. Análises dos fermentados

Após o processo de fermentação as amostras foram transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 250 ml, no qual completou-se o volume. Retirou-se 15 ml que passaram por centrifugação para separação do vinho fermentado e do resíduo. O sobrenadante foi recuperado e filtrado com membrana

de 0,45 µm de porosidade (membrana HV em PVDF, Millipore). Diluiu-se, 10 vezes, utilizando água ultrapura (destilada e deionizada), e procederam-se as análises cromatográficas com o objetivo de determinar o teor de etanol e açúcares presentes no vinho. As concentrações foram calculadas por meio de curvas-padrão relativas ao analito de interesse.

3.6.3. Análise dos Dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, arranjado em um esquema de 7 tratamentos (diferentes combinações de uma cultivar de batata-doce industrial, uma cultivar de mandioca e uma cultivar de milho), 1 meio fermentativo (água) e 3 repetições, totalizando 21 parcelas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa *Assistat* versão 7.5 Beta-2010 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.6.4. Cálculo da Eficiência do processo fermentativo

A eficiência das fermentações foi calculada utilizando-se os valores de etanol produzido (g/100 g) e de etanol teórico (g/100 g), segundo a Equação 8:

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{Etanol experimental}}{\text{Etanol teórico}} \times 100$$

(8)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises de composição das matérias-primas

As matérias-primas batata-doce industrial, mandioca e milho apresentaram teores médios de umidade iguais a 66,77%, 66,52% e 13,77%, respectivamente.

Com relação à batata-doce, Zhang et al. (2010a), e Martins (2010), para variedades cultivadas na China e no Tocantins, respectivamente, encontraram teores de umidade de 65,5% e 63,38%, respectivamente, configurando valores muito próximos ao encontrado nesta pesquisa. Há relatos de valores inferiores, como de 59,5% (SRICHUWONG et al., 2012), e de superiores, como 70,9% (DUVERNAY, 2008). Esses valores podem variar bastante: Lázari (2011), ao avaliar 100 clones, encontrou valores entre 73% e 59,95%; e Santa-Maria et al. (2009) observaram variedades variando de 66,8 a 82,9%.

Para os teores de umidade vinculados à mandioca, Carvalho (2011) avaliou três cultivares e obteve média de 58,45%. O fato de se ter obtido nesta pesquisa um valor médio menor, pode ser devido às diferenças entre a variedade utilizada e o período de colheita, conforme constatado por Salla (2008).

Quanto ao milho, NREL (2000) verificou um teor próximo ao encontrado no presente estudo, de 15% de umidade, enquanto Nikolic´ et al. (2009) relataram um valor menor, de 10,34%.

4.1.1. Açúcares solúveis

A tabela 11 mostra os resultados obtidos para a análise dos açúcares solúveis presentes nas matérias-primas antes do processo de hidrólise.

Tabela 11: Valores médios da composição centesimal das matérias-primas utilizadas. Valores expressos em base seca

| Matéria-prima | Glicose* (%) | Frutose (%) | Maltose (%) | Total (%) |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Batata-doce | 0,71 | 1,06 | 1,64 | 3,41 |
| Mandioca | 0,15 | 0,42 | 1,16 | 1,73 |
| Milho | 0,08 | 0,07 | 1,51 | 1,65 |
| CV | 3,84 | 3,89 | 4,29 | - |

CV% = Coeficiente de variação em %.

Ainda em 1915, Miyake determinou que os açúcares dos tubérculos de batata-doce são compostos tanto de açúcares redutores, como de não-redutores. Glicose e frutose representam os açúcares redutores encontrados, enquanto que o açúcar não-redutor encontrado por Miyake, 1915 é a sacarose, excluindo-se a presença, de pentoses. Outro estudo destacou a presença de 3,1% de açúcares solúveis (ZHANG et al., 2013). Teor próximo ao observado nesta investigação (Tabela 11).

Já para o milho, Manikandan e Viruthagirisugars (2010), determinaram um teor de açúcares totais semelhante, de 1,7%, e NREL (2000) apontou um teor próximo, de 2%.

Para a mandioca, Nuwamanya et al. (2012) relataram valores maiores, pois a mesma possuía 2,65% de açúcares redutores.

4.1.2. Glicose Total e Amido

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para glicose e teor de amido, pelo método da hidrólise enzimática, da batata-doce industrial, da mandioca e do milho.

Tabela 12: Valores médios da glicose total e do amido nas matérias-primas utilizadas. Valores expressos em base seca (b.s.) e úmida (b.u)

| Matéria-prima | Glicose b.s. (%) | Amido b.s. (%) | Amido b.u. (%) |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Batata-doce | 74,08 | 66,03 | 22,11 |
| Mandioca | 67,75 | 60,84 | 20,22 |
| Milho | 53,84 | 48,38 | 41,72 |
| CV | 6,16 | 6,19 | 5,21 |

CV% = Coeficiente de variação em %.

Jin et al. (2012), em uma pesquisa com o objetivo de selecionar dentre 10 variedades de batata-doce aquelas mais apropriadas para a produção de etanol, verificaram que o teor de açúcares fermentescíveis variou 15,89 a 36,04%, no tubérculo fresco. No presente estudo, este componente apresentou-se dentro desta variação, 24,80% na batata-doce fresca.

Quanto ao teor de amido da batata-doce, a literatura relata médias de 34,12% em batata-doce cultivada na China (ZHANG et al., 2010a), de 27,8 e 28,5% em clones produzidos no Japão (SRICHUWONG et al., 2012), de 23,7% em raízes frescas (ZHANG et al., 2013), teores médios de 70,3 a 71,8% (JUMP et al., 1944) e de 82,89 a 67,11% (LÁZARI, 2011), ambos em peso seco. Mais proximamente ao contexto desta pesquisa, Martins (2010) apresentou clones com 54,59 a 60,62% de amido, destacando-se produtivamente a variedade DUDA com 55,36% (b.s.), um valor inferior ao encontrado nesta investigação (66,03%), enquanto Pavlak et al. (2011), utilizando a mesma variedade, encontrou um valor médio de 24,4%, nesse caso, superior ao mostrado na Tabela 12.

Quanto a mandioca, Nitayavardhana et al. (2010) utilizaram cultivar com 79,2% de amido (b.s.), enquanto Lin et al. (2011) empregaram farinha com 76%. Usando esta raiz para a produção de chips secos (13% de umidade), Dai et al. (2006) obtiveram teor de amido em torno de 75%. Ressalta-se que todos esses teores foram maiores do que a média encontrada para a cultivar utilizada nesta pesquisa. Já Carvalho (2011) aponta o conteúdo de amido com percentagens variando de 42,78 a 49,00%, também em base seca, que estão abaixo dos 60,84% evidenciados nesta pesquisa.

Com relação ao milho utilizado, este apresentou média de 48,38% (b.s.) de amido, sendo este um valor bem abaixo daqueles relatados por NREL (2000),

Manikandan e Viruthagiri (2010) e por Nikolic´ et al. (2009), que foram de 70, 74,9 e 76,75%, respectivamente.

Vê-se, assim, pelas análises realizadas, que as matérias-primas utilizadas neste experimento possuíam alta concentração de amido, especialmente ponderando-se a possibilidade deste componente ser realisticamente convertido em etanol.

4.2. Primeiro ensaio

O planejamento experimental completo 2^2 foi realizado com a finalidade de se avaliar o efeito das seguintes variáveis independentes: concentrações de α -amilase e de glicoamilase, na hidrólise do amido, tendo-se como resposta a concentração de açúcares redutores. Os resultados experimentais e os previstos pelo modelo estatístico são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Rendimento dos açúcares redutores (AR) observados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Corrida | Codificado | | Real | | | |
|---------|----------------|----------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | α -amilase (ml/Kg amido) | glicoamilase (ml/Kg amido) | AR exper. (mg/ml) | AR previsto (mg/ml) |
| 1 | -1 | -1 | 0,8 | 1,50 | 33,32 | 34,69 |
| 2 | 1 | -1 | 3,4 | 1,50 | 42,71 | 40,9 |
| 3 | -1 | 1 | 0,8 | 6,38 | 47,39 | 50,2 |
| 4 | 1 | 1 | 3,4 | 6,38 | 44,30 | 44,0 |
| 5 | - α | 0 | 0,26 | 3,94 | 43,37 | 44,7 |
| 6 | + α | 0 | 3,94 | 3,94 | 45,94 | 44,7 |
| 7 | 0 | - α | 2,1 | 0,49 | 32,88 | 33,6 |
| 8 | 0 | + α | 2,1 | 7,39 | 48,11 | 46,7 |
| 9 | 0 | 0 | 2,1 | 3,94 | 41,49 | 44,7 |
| 10 | 0 | 0 | 2,1 | 3,94 | 48,08 | 44,7 |
| 11 | 0 | 0 | 2,1 | 3,94 | 45,89 | 44,7 |
| 12 | 0 | 0 | 2,1 | 3,94 | 43,89 | 44,7 |
| 13 | 0 | 0 | 2,1 | 3,94 | 44,38 | 44,7 |

• $\pm \alpha$ = 1,4142; X₁, X₂ = variáveis dependentes: concentração de α -amilase (Liquozyme® SC) e concentração de glicoamilase (Spirizyme® Fuel), respectivamente. CV no ponto central = 4,27%

Com os valores obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 14. Na tabela de coeficientes de regressão os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q.

Tabela 14: Coeficientes de regressão do rendimento dos açúcares redutores (AR), observados na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho), e obtidos através da metodologia superfície de resposta

| Parâmetros | Coefficiente de regressão | Erro Padrão | T (7) | p-valor | Lim. Conf. - 95% | Lim. Confi. 95% |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------|--------|---------|------------------|-----------------|
| Média* | 44,747 | 0,924 | 48,405 | 0,000 | 42,561 | 46,933 |
| α -amilase (L) | 1,242 | 1,462 | 1,699 | 0,133 | -0,972 | 5,940 |
| α -amilase (Q) | -0,207 | 1,567 | -0,265 | 0,799 | -4,121 | 3,292 |
| glicoamilase (L)* | 4,650 | 1,462 | 6,362 | 0,000 | 5,843 | 12,755 |
| glicoamilase (Q)* | -2,288 | 1,567 | -2,919 | 0,022 | -8,282 | -0,869 |
| α -amilase x glicoamilase* | -3,121 | 2,067 | -3,019 | 0,019 | -11,129 | -1,354 |

*Parâmetros significativos a 95% de confiança. R^2 : 0,897. As enzimas α -amilase e glicoamilase correspondem a Liquozyme® SC e Spirizyme® Fuel, respectivamente.

Os parâmetros, concentrações da enzima glicoamilase Spirizyme® Fuel (pelos modelos linear e quadrático) e a interação entre as duas enzimas (α -amilase x Spirizyme), foram significativos ($p < 0,05$) como pode ser visualizado na Tabela 14 e no gráfico de Pareto (Figura 2).

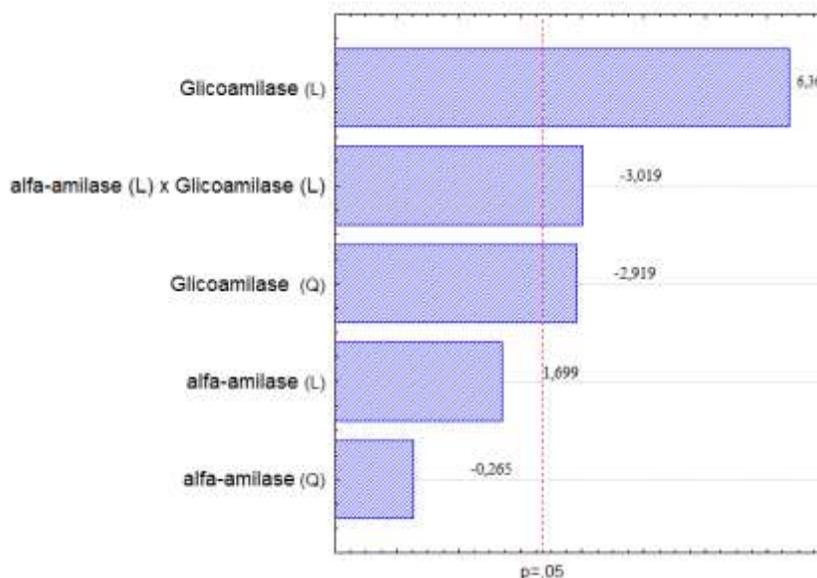


Figura 2: Gráfico de Pareto observado na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (90°C/1,5h) e glicoamilase (60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

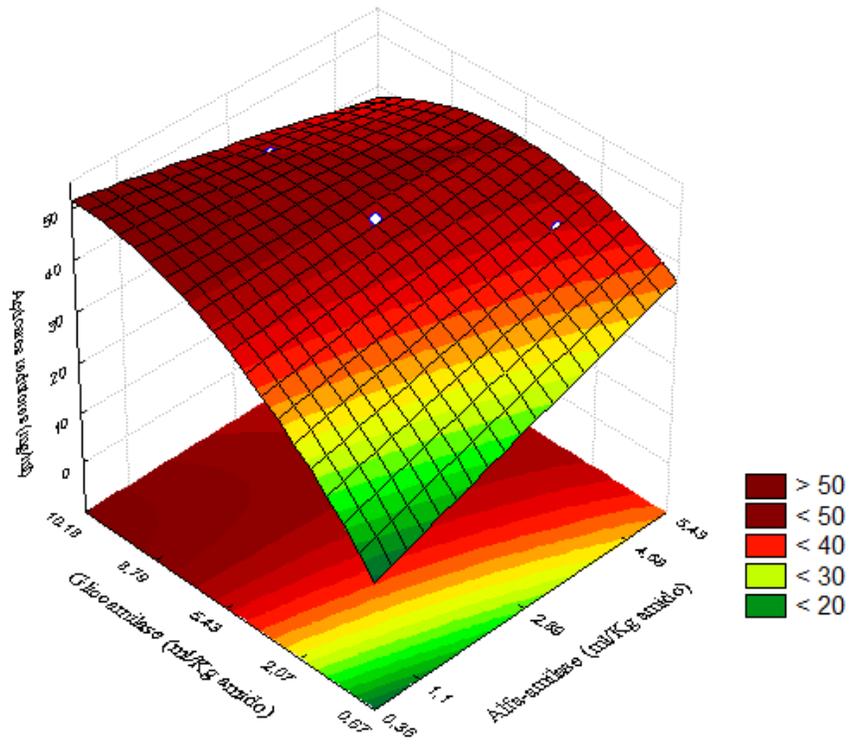
Observou-se que, com 95% de confiança, a concentração de glicoamilase apresentou maior influência na produção de açúcares redutores, proporcionando efeito positivo na resposta, enquanto a interação entre as duas enzimas influenciou negativamente. Esse resultado indica que o aumento da concentração de glicoamilase pode incrementar o teor de AR, e que, por outro lado, o aumento da concentração de α -amilase pode levar à diminuição desse teor.

Com isso, tornou-se possível construir um modelo matemático de 2ª ordem com os coeficientes de regressão dos parâmetros significativos (Eq. 9). Os coeficientes de regressão estatisticamente não significativos a 95% de nível de confiança, foram excluídos do modelo. Na equação, nominou-se a variável dependente para melhor visualização. Dessa maneira, considerou-se a concentração de α -amilase (ml/Kg amido) correspondente a “ X_1 ” e a concentração de glicoamilase (ml/Kg amido) correspondente a “ X_2 ”.

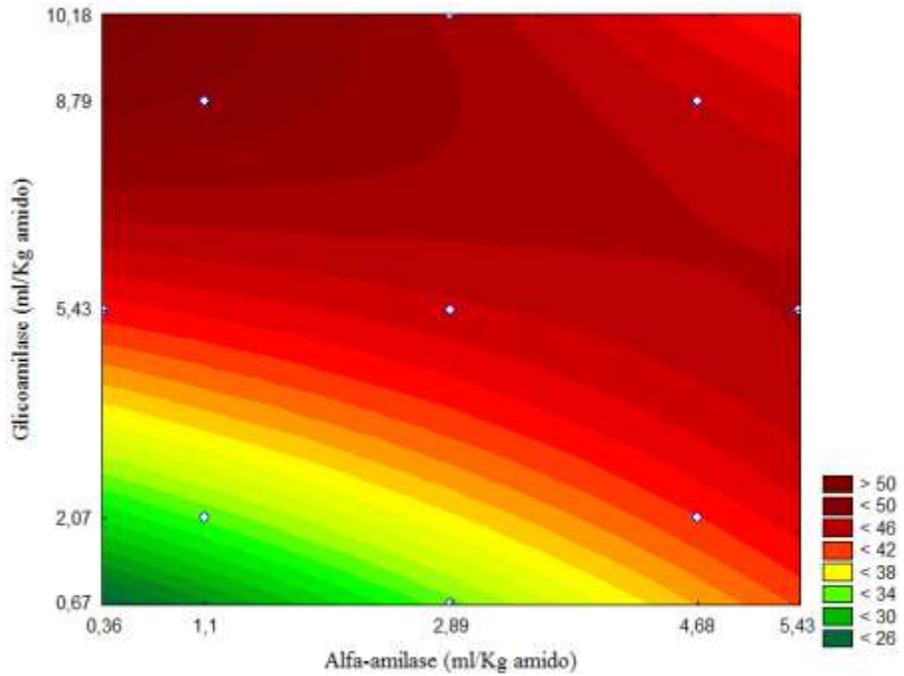
$$\text{Açúcares redutores (mg/ml)} = 44,747 + 4,650X_2 - 2,288X_2^2 - 3,121X_1X_2 \quad (9)$$

A qualidade do ajustamento do modelo adotado foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2), calculado em 0,897, indicando-se que 89% da variabilidade na resposta poderia ser explicada pelo modelo. Isto prova que a equação (9) forneceu um modelo adequado para descrever a resposta referente à taxa de produção de açúcares redutores.

A Figura 3(a) mostra as curvas tridimensionais de superfície de resposta, que foram construídas com base nos dados mostrados na Tabela 13 com o intuito de se compreender a interação da concentração ótima de cada componente (α -amilase e glicoamilase) necessários para a máxima produção de açúcares redutores.



(a)



(b)

Figura 3: (a) Superfície de Resposta (b) Curvas de níveis. Observadas na avaliação do efeito das concentrações de α -amilase (Liquozyme® SC, 90°C/1,5h) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel, 60°C/2h) (Ensaio 1) sobre a hidrólise da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

Observando-se o gráfico da superfície de resposta e as curvas de níveis da relação da concentração de α -amilase e glicoamilase, em relação à concentração de açúcares redutores, verifica-se que a faixa ótima ocorre com 0,36 ml/Kg (0,45 g/Kg_{amido}) de amido e 10,18 ml/kg de amido (11,71 g/Kg_{amido}), respectivamente.

A adição de maior quantidade de α -amilase (Liquizyme® SC) não resultou no aumento dos açúcares redutores. Segundo Duvernay (2008), isto pode ter sido devido à saturação dos locais de ligação disponíveis por outras amilases nativas, o que poderia sugerir um "excesso" de α -amilase adicionada, resultando em saldo de enzima não utilizada. Além disso, Zhang e Oates (1999) encontraram que o amido de batata-doce geralmente contém quantidades elevadas de amilopectina, uma molécula que contém ligações que não são rompidas pelas amilases.

Estudo realizado por Duvernay (2008), testando diferentes taxas de α -amilase (Liquozyme® SC) na hidrólise de batata-doce industrial, também verificou que adição de uma quantidade maior de α -amilase não resultou no aumento esperado de açúcares redutores, e conseqüente diminuição do amido, determinando que a quantidade de α -amilase que converteria a maioria do amido disponível era de 0,45 KNU-S/grama de peso seco da matéria-prima. O mesmo autor também concluiu que a sacarificação era capaz de aumentar a quebra de amido, contudo, a sua principal função foi a de converter as dextrinas solúveis resultantes da liquefação em açúcares fermentáveis, com adição de 5,0 AGU/g_{BDI} de Spirizyme Ultra. Sabendo-se a atividade de α -amilase e de glicoamilase, a densidade das enzimas e o teor de amido, pode-se verificar que a concentração utilizada por Duvernay (2008) de α -amilase foi 5 vezes maior e a concentração de glicoamilase foi de 3 vezes menor, dos encontrados no presente estudo.

Para realizar a liquefação e sacarificação, Srichuwong et al. (2012) adicionaram 13,6 ml de Liquozyme® SC e 0,11 ml de Spirizyme Fuel, enquanto Zhang et al. (2010a) descreveram o uso de 0,12 KNU (1,334 g) de α -amilase, mais 1,6 AGU (3,2 g) de glicoamilase, para cada quilograma de BDI. Enquanto Jin et al. (2012), utilizaram 120 KNU (1,334 g) de Liquozyme® Supra e 750 AGU (1,5 g) de glicoamilase, para cada quilograma de amido. Por sua vez, Lázari (2011) utilizou

0,03 ml da enzima α -amilase Termamyl 120L para cada 1 Kg de farinha de BDI, previamente seca.

Em trabalho utilizando a mandioca, Chen et al. (2011) adicionaram 1,6 g amilase e 8,4 g de glicoamilase para cada quilograma de amido. Já Carvalho (2011) fez sua hidrólise utilizando 2,5 ml, tanto de amilase Termamyl 120L, quanto de glicoamilase AMG 300L. Em outro trabalho (Yingling et al., 2011) a metodologia de superfície de resposta foi usada para se otimizar as condições de hidrólise enzimática de mandioca, sob baixa temperatura. As condições ótimas de hidrólise encontradas por estes autores foram de 264 IU/g_{amido} de α -amilase (100 g/Kg_{amido}) e 392 IU/g_{amido} (5 g/Kg_{amido}) de glicoamilase, com taxa de utilização de amido de 92,50 a 94,64%. Nesse caso, relacionou-se a diferença verificada na concentração de uso com o fato de que as atividades das enzimas utilizadas por Yingling et al. (2011) eram diferentes das atividades da α -amilase e glicoamilase utilizadas neste experimento.

Em experimento com milho, Nikolic' et al. (2009) relataram que para cada quilograma de amido foi necessário adicionar-se 19,95 g de α -amilase Termamyl SC e 119,73 g de glicoamilase SAN Extra L, para se obter a completa sacarificação.

Observou-se que na maioria dos estudos a quantidade de glicoamilase é superior a concentração de α -amilase, o que corrobora com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Estudo conduzido por Chen et al. (2011) demonstrou que a hidrólise enzimática ocorria principalmente na superfície da molécula de amido, a qual era amplamente desgastada nesse processo, ocorrendo também, em camadas. A forma, volume e o tamanho dos poros, que são aberturas para o interior dos grânulos de amido foram os parâmetros que mais influenciaram na taxa de penetração das enzimas no interior desses. No entanto, segundo Tester e Somerville (2000), a intensidade da hidrólise também estaria intimamente relacionada com o grau de gelatinização, que tem importantes implicações para a produção de álcool e em outros processos industriais.

A fim de se conhecer o perfil do hidrolisado, a figura 4 mostra o perfil dos sacarídeos provenientes da hidrólise da mistura amilácea, obtido na corrida 3.

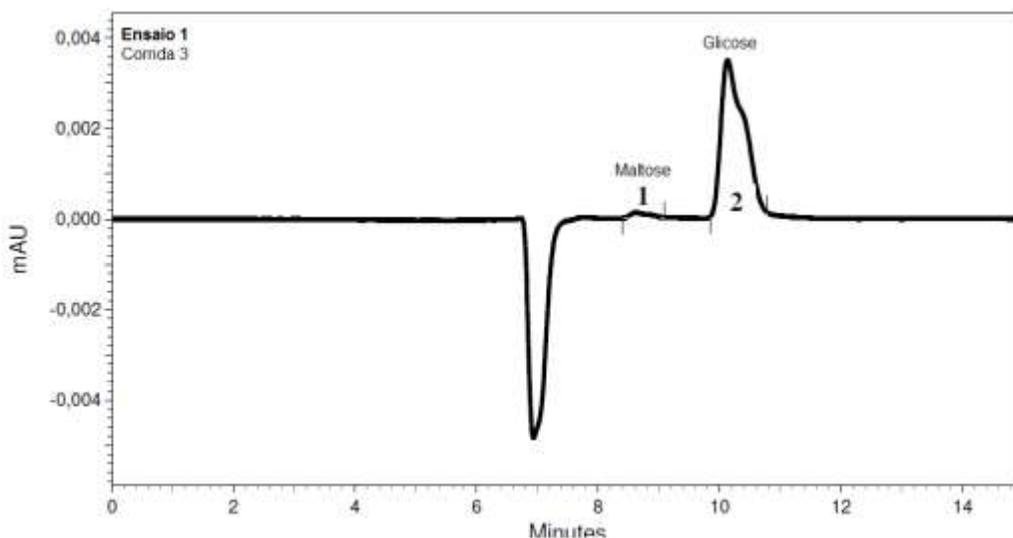


Figura 4: Cromatograma, obtido por CLAE, na corrida 3 do Ensaio 1 utilizando a condição de 2,1 ml de α -amilase/Kg de amido e 7,39 ml de glicoamilase/Kg de amido (Itens 4.3.5 e 5.3.1), para a hidrólise da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C

Pode-se verificar que após o processo de hidrólise o monossacarídeo predominante foi a glicose, que é um dos açúcares preferenciais para o metabolismo como fonte de carbono da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (VAN DEN BRINK et al., 2009).

4.2.1. Validação do modelo

Por meio do presente estudo foi possível obter-se um modelo estatístico capaz de prever o comportamento das variáveis dependentes (respostas) em função das variáveis independentes. A hidrólise conduzida sob a melhor condição indicada pela superfície de resposta, que consistiu em 0,36 ml de α -amilase/Kg de amido (31 μ L/3,05g de amido) e 10,18 ml de glicoamilase/Kg de amido (1 μ L/3,05g de amido), resultou em 52,9 mg/ml de glicose e 2,2 mg/ml de maltose.

Em comparação, Duvernay (2008) obteve 862,2 e 743,9 mg de açúcares/g de amido com a farinhas e com a batata-doce fresca, respectivamente, enquanto no presente estudo a mistura (BDI + Ma + Mi) apresentou 1449,13 mg de glicose e 70,73 mg de maltose, por grama de amido.

Na figura 5 pode-se observar o cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 1 utilizando a condição otimizada de 0,36 ml de α -amilase/Kg de amido e 10,18 ml de glicoamilase/Kg de amido.

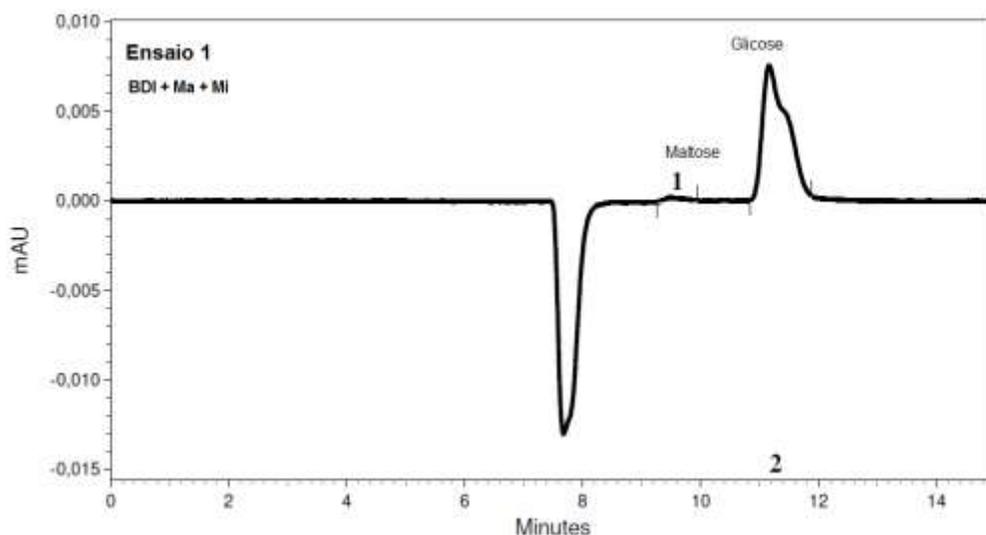


Figura 5: Cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 1 utilizando a condição otimizada de 0,36 ml de α -amilase/Kg de amido e 10,18 ml de glicoamilase/Kg de amido (Itens 4.3.5 e 5.3.1), para a hidrólise da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C

4.3. Segundo ensaio

Um segundo planejamento experimental completo 2² foi realizado para se avaliar o efeito do tempo de fermentação, e da concentração do fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*), sobre o rendimento de etanol. A Tabela 15 mostra os resultados experimentais e os previstos pelo modelo estatístico.

Tabela 15: Rendimento de etanol observado na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Ensaio | Codificado | | Tempo de fermentação (horas) | Concentração de levedura (% p/p) | Real | | Eficiência (%) |
|--------|----------------|----------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------|
| | X ₃ | X ₄ | | | Etanol experimento (µl/ml) | Etanol previsto (µl/ml) | |
| 1 | 0 | - α | 0,24 | 17 | 5,06 | 4,88 | 14,20 |
| 2 | 0 | 0 | 1,5 | 24 | 21,01 | 22,25 | 58,92 |
| 3 | 1 | 1 | 2,25 | 28 | 21,50 | 25,08 | 60,32 |
| 4 | 0 | 0 | 1,5 | 24 | 23,00 | 22,25 | 64,54 |
| 5 | -1 | 1 | 2,25 | 28 | 19,86 | 25,08 | 55,67 |
| 6 | + α | 0 | 1,5 | 24 | 21,02 | 22,25 | 58,95 |
| 7 | 1 | -1 | 0,75 | 20 | 7,59 | 11,59 | 21,28 |
| 8 | 0 | + α | 2,76 | 31 | 26,36 | 23,95 | 73,95 |
| 9 | 0 | 0 | 1,5 | 24 | 16,59 | 22,25 | 46,51 |
| 10 | -1 | -1 | 0,75 | 20 | 9,91 | 11,59 | 27,79 |
| 11 | - α | 0 | 1,5 | 24 | 16,79 | 22,25 | 47,14 |

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos após análise dos fermentados por CLAE. Foram determinados os coeficientes de regressão, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q.

Tabela 16: Coeficientes de regressão para rendimento de etanol, observados na avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

| Parâmetros | Coef. de regressão | Erro Padrão | T (7) | p-valor | Lim. Conf. - 95% | Lim. Conf. 95% |
|----------------------|--------------------|-------------|--------|---------|------------------|----------------|
| Média* | 22,253 | 1,323 | 16,823 | 0,000 | 18,853 | 25,653 |
| Tempo (L) | 0,662 | 0,810 | 0,817 | 0,451 | -1,421 | 2,744 |
| Tempo (Q) | -2,322 | 0,964 | -2,408 | 0,061 | -4,800 | 0,156 |
| Conc. Levedura (L)* | 6,747 | 0,810 | 8,330 | 0,000 | 4,665 | 8,830 |
| Conc. Levedura (Q)* | -3,919 | 0,964 | -4,065 | 0,010 | -6,397 | -1,440 |
| Tempo x Conc. Leved. | 0,989 | 1,146 | 0,863 | 0,428 | -1,956 | 3,933 |

*Parâmetros significativos a 95% de confiança

R²: 0,9468

O parâmetro concentração de levedura (linear e quadrático) mostrou-se significativo (p<0,05) como pode ser visualizado na Tabela 16 e no gráfico de Pareto (Figura 6).

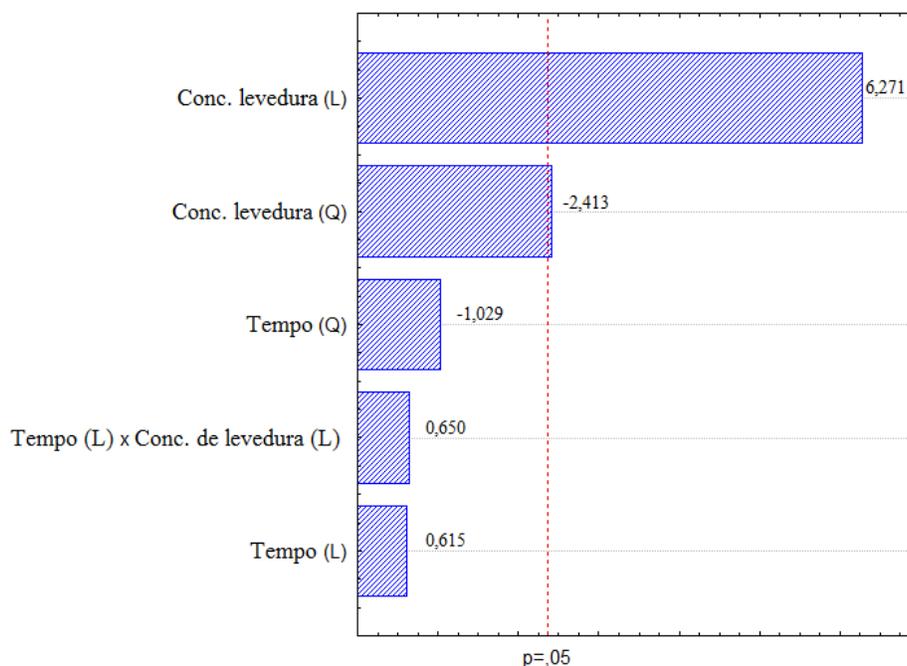


Figura 6: Gráfico de Pareto, mostrando o efeito das variáveis do modelo, obtido pela avaliação do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

Observou-se com 95% de confiança, que a concentração de levedura apresentou a maior influência no rendimento de etanol, proporcionando efeito positivo na resposta. Assim, aumentando-se a concentração de levedura, pode-se favorecer a concentração de etanol obtido.

Foi possível construir um modelo matemático de 2ª ordem com os coeficientes de regressão dos parâmetros significativos (Eq. 5). Os coeficientes de regressão estatisticamente não significativos, a 95% de nível de confiança, foram excluídos do modelo. Na equação, a variável dependente esta codificada. Considera-se a concentração de Concentração de Levedura (% p/v) correspondente a “X₄”.

$$\text{Etanol } (\mu\text{l/ml}) = 22,253 + 6,747X_4 - 3,919X_4^2 \quad (5)$$

Expressa-se a qualidade do ajustamento do modelo adotado pelo valor do coeficiente de determinação (R²), calculado em 0,9468, indicando-se que 94,68% da variabilidade na resposta poderia ser explicada pelo modelo. Isto prova que a

equação (5) forneceu um modelo adequado para descrever a resposta referente à taxa de produção de etanol.

A Figura 7 mostra as curvas tridimensionais de superfície de resposta, que foram construídas com base nos dados mostrados na Tabela 15 com o intuito de se compreender a interação da concentração ótima de levedura, com o tempo de fermentação, necessários para a produção máxima de etanol.

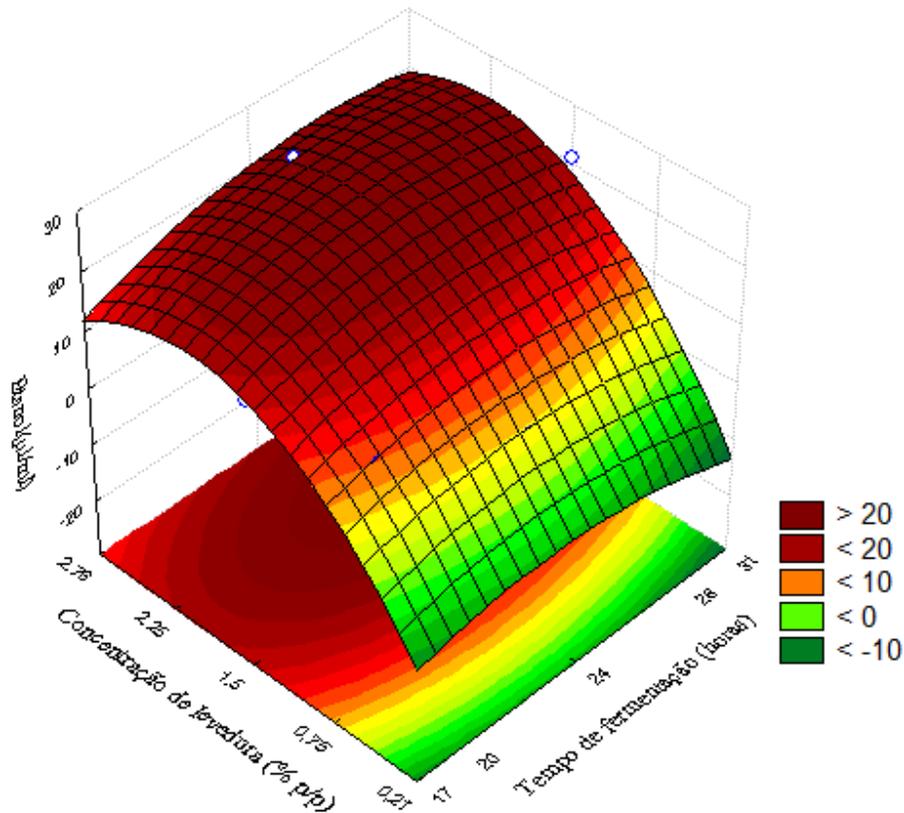


Figura 7: Superfície de Resposta do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

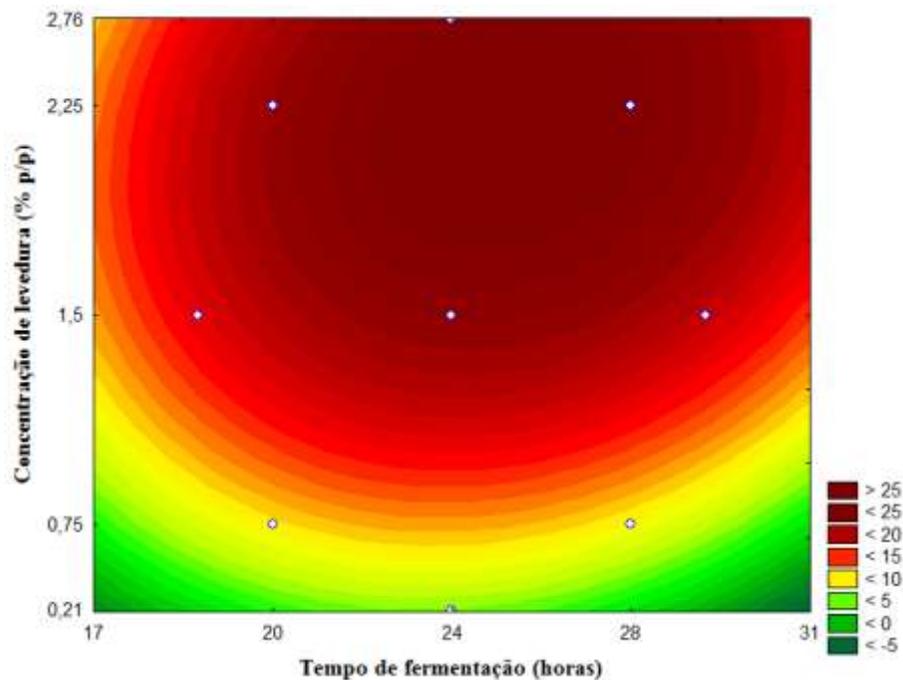


Figura 8: Curvas de níveis do efeito do tempo de fermentação e concentração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ensaio 2, a 32°C/80 rpm) sobre o teor de etanol obtido a partir da mistura amilácea (batata-doce, mandioca e milho)

A metodologia estatística superfície de resposta demonstrou que a condição otimizada, nas condições experimentais avaliadas, para fermentação da mistura (BDI + Ma + Mi) foi de 2,25 % de fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*), sob 24 horas de fermentação, pela qual se obteve um rendimento de etanol superior a 20 µl/ml.

4.3.1. Validação de método

Para validar a concentração ideal, um experimento foi conduzido sob a condição ideal, 2,25% de fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*) e 24 horas de fermentação, tendo-se observado um rendimento de 38,22 µl/ml (0,83 g/g_{amido} ou 0,46 g/g_{mistura}). Isto pode ter sido devido ao fato de que a enzima glicoamilase utilizada neste experimento era para uso em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), um procedimento que pode ajudar a melhorar a extensão da hidrólise do amido sob condições de inibição pelo produto. Duvernay (2008), explicou que durante SSF, os microorganismos

convertem a substância inibitória – glicose - para o produto final, enquanto as enzimas disponíveis continuam a quebrar o amido em açúcares simples.

Há citações de trabalhos onde foram obtidos rendimentos superiores ao encontrado para a mistura (BDI + Ma + Mi) utilizada nesta pesquisa, que foi de 0,46 g/g_{mistura}, conforme descrevem Nikolic´ et al. (2009), que alcançaram 0,56 g de etanol/g de milho quando uma fermentação alcoólica foi realizada por *Zymomonas mobilis*, e por Zhang et al. (2013) que calculou 0,144 g de etanol por grama de batata-doce fresca, que analogicamente corresponderia à aproximadamente 0,6 g etanol/g de batata-doce seca.

Quanto ao rendimento teórico do processo, há relatos de resultados com 77,46% (NIKOLIC´ et al., 2009), de 90,7% na hidrólise da batata-doce (ZHANG et al., 2010a), e de 87,2% do rendimento teórico com batata-doce crua (ZHANG et al., 2013). Pereira et al., (2010) desenvolvendo uma composição de meio otimizado baseado na milhocina, utilizando a metodologia superfície de resposta, verificou que utilizando-se uma estirpe industrial de *Sacharomyces cerevisae* (PE-2) foi possível alcançar um rendimento médio de 93% de etanol.

A eficiência do processo desenvolvido nesta investigação alcançou uma média de 127,92%, o que pode ser atribuído à metodologia utilizada para se calcular o teor de amido, pois a glicoamilase utilizada é própria para a SSF, e como explicado anteriormente, esse material tende a elevar a taxa de hidrólise.

No presente estudo, determinou-se uma taxa de 2,25% de inóculo da levedura, que consiste num valor muito próximo àquele estabelecido em pesquisa conduzida por Nikolic´ et al. (2009), na qual utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, que sugeriram um processo otimizado com uso de 2% de inóculo, indicando-se não haver necessidade de se utilizar concentrações maiores de inóculo, haja vista que não se evidenciaram incrementos nas concentrações de etanol produzido. Em outro estudo, Srichuwong et al. (2012), usaram uma quantidade bem inferior, onde o fermento foi adicionado para se obter 0,34 g de células secas /dm³ do mosto, que corresponde a 0,34%.

No presente trabalho foi utilizada a linhagem de panificação na fermentação do hidrolisado da mistura, tendo-se em consideração que Pavlak et al. (2011), ao estudarem a fermentação do hidrolisado de batata-doce, utilizaram duas linhagens industriais (JP-1 e PE-2), e a linhagem de panificação (Fleischmann®) de *Saccharomyces cerevisiae*, não tendo sido encontrada diferença significativa para os parâmetros rendimento, eficiência e balanço de massa, entre essas linhagens.

Por meio dos resultados obtidos no Ensaio 2 do presente experimento, estabeleceu-se que seria utilizado como ideal o tempo de 24 h de fermentação. Nikolic´ et al. (2009), investigando a fermentação alcoólica de milho, determinaram um tempo ótimo de fermentação igual a 38 h. Já Duvernay (2008) comparando-se farinha de batata-doce com BDI fresca, estabeleceu um tempo ótimo de 48 horas, sugerindo não ser necessária a adição de qualquer tipo de suplemento (sais melhoradores). Este autor também verificou um comportamento semelhante no rendimento global e na utilização de açúcar, tanto com a farinha, quanto com a batata-doce fresca, indicando que o desempenho da levedura era independente da preparação da matéria-prima, fresca ou seca, desde que o açúcar estivesse disponível para essa conversão.

Verificou-se, portanto, que a condição ótima experimental indicou, estatisticamente, que o processo utilize uma concentração média de levedura igual a 2,25%, por um tempo médio de fermentação igual a 24 h. Esses parâmetros, lançados no modelo matemático determinado, gerariam um rendimento de 25,08 µl/ml.

Na figura 9 pode-se observar o cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 2 utilizando a condição de 2,25 % de levedura, sob 24 horas de fermentação.

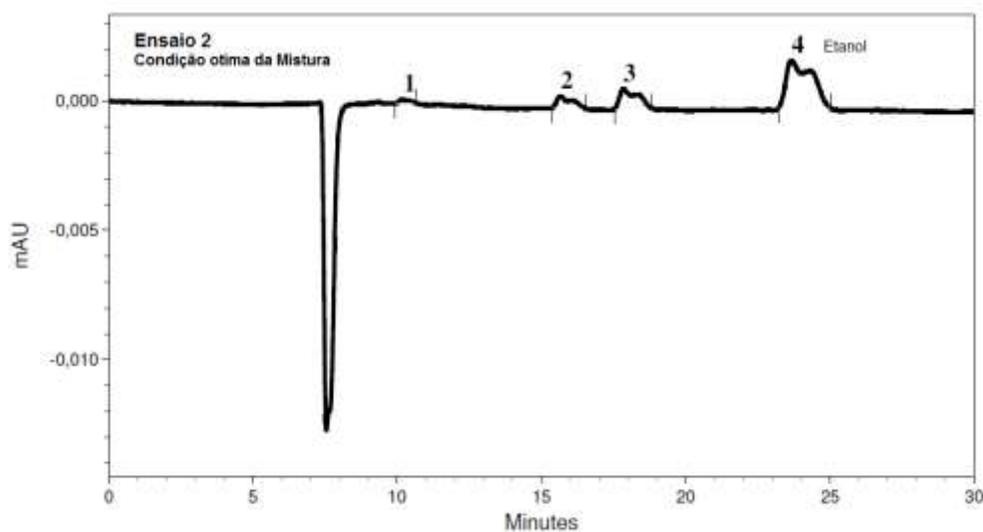


Figura 9: Cromatograma, obtido por CLAE, para validação do modelo do Ensaio 2 utilizando a condição otimizada de 2,25 % de levedura, sob 24 horas de fermentação (Itens 4.4.5 e 5.4.1), para a fermentação da mistura de batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C

4.4. Terceiro ensaio

Este ensaio foi realizado para avaliar a eficiência da fermentação das três matérias-primas (Batata-doce industrial, mandioca e milho), nas combinações apresentadas na Tabela 10, utilizando-se as melhores condições encontradas no 1º (0,36 ml de α -amilase e 10,18 ml de glicamilase por kg de amido) e no 2º ensaio (concentração de levedura de 2,25% e 24 h de fermentação). Os rendimentos obtidos estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Valores médios do rendimento em etanol obtidos no Ensaio 3, em diferentes combinações das matérias-primas.

| Tratamento | Etanol (g/Kg_{amido} b.s.) | Etanol (L/t) | Etanol (L/ha)* |
|----------------------|---|---------------------|-----------------------|
| BDI | 758,84 a | 202,51 cd | 8100,32 c |
| Ma | 812,96 a | 201,74 cd | 2824,43 e |
| Mi | 804,16 a | 410,07 a | 1640,27 e |
| Ma + Mi | 873,01 a | 292,18 b | 4824,92 d |
| Mi + BDI | 743,67 a | 261,15 bc | 9485,42 b |
| BDI+ Ma | 717,86 a | 185,37 d | 10201,10 b |
| BDI + Ma + Mi | 832,52 a | 256,86 bc | 13301,62 a |
| CV (%) | 7,56 | 9,42 | 6,62 |

As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste ao nível de 5% de probabilidade. BDI = batata-doce industrial. Ma = mandioca. Mi = milho. CV% = Coeficiente de variação em %.*Considerando o rendimento da BDI, MA e MI em 40 t/ha, 14 t/ha e 4 t/ha, respectivamente.

Analisando os dados da Tabela 17, não se verificou diferença estatística significativa entre as diferentes misturas para o parâmetro rendimento de etanol por Kg de amido. Contudo, quando analisado o rendimento das misturas em litros por tonelada, verificou-se diferença estatística entre os tratamentos, podendo-se destacar que o tratamento Mi proporcionou o maior rendimento, seguido daqueles cujas misturas continham essa matéria prima (Ma+Mi e Mi+BDI). Isto pode ser explicado pelo fato que a batata-doce e a mandioca continham em torno de 66% de umidade, enquanto o milho apresentava 13%, resultando que na mesma tonelagem a mandioca e a batata-doce continham aproximadamente 340 Kg de matéria-seca, contra 862 Kg para o milho.

Por outro lado, ao se considerar o rendimento de campo, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, sendo que a mistura das amiláceas (BDI, Ma e Mi) rendeu 13301,62 litros de etanol por hectare, explicados pelo alto rendimento da batata-doce (40 t/ha) e médio da mandioca (14 t/ha) comparados com o baixo rendimento do milho, de apenas 4 t/ha. Ziska et al. (2009) exibiram valores de rendimentos de até 6717 L/ha, 3797 L/ha e 8839 L/ha, para a mandioca, milho e batata-doce, respectivamente, o que vem reforçar o fato de que as culturas tuberosas tendem a apresentarem maiores rendimentos de etanol, por área, do que o milho.

Ao avaliar o rendimento de etanol de três cultivares de mandioca, com adição de soro de leite ao mosto, Carvalho (2011) apresentou rendimento de até 211,43 litros de etanol por tonelada de raiz utilizando 100% de soro de leite como meio fermentativo. No presente estudo, os valores obtidos foram de 201,74 L/t de mandioca e de 292,18, 185,37 e 256,86 L/t para Ma+MI, Ma+BDI e Mi+BDI, respectivamente. Zhang et al. (2010a), aplicando um *design* de superfície de resposta com a finalidade de obter os parâmetros ótimos para fermentação de batata-doce, produziu 135,1 g de etanol/kg de batata-doce, e concluiu que eram necessários de 5,99 a 13,86 t para produzir uma tonelada de etanol anidro, variação esta que era devido aos diferentes teores de açúcares fermentáveis, com o que corroboraram Jin et al. (2012). Srichuwong et al. (2012) concluíram cerca 205 litros podiam ser produzidos a partir de 1 tonelada batata-doce fresca, isto com base em uma conversão completa do amido disponível.

Cabe enfatizar que exaustivamente pesquisando a literatura pertinente, não foram encontrados estudos aprofundados vinculados à fermentação conjunta de fontes amiláceas para a produção de etanol. Há relatos de misturas de diferentes classes de fontes de carbono, como por exemplo, amilácea com celulósica, conforme o estudo desenvolvido por Erdei et al. (2010), que ao avaliarem as performances da sacarificação e fermentação simultâneas de palha de trigo (pré-tratada a vapor, SPWS) e farinha de trigo pré-sacarificada (PWM), obtiveram o máximo rendimento de etanol (99%), numa concentração de etanol de 56,5 g/L. Mais recentemente Chu et al. (2012), também avaliaram uma mistura da batata-doce em conjunto com esterco de vaca e lodo de esgoto quanto à viabilidade de produção dos biocombustíveis (hidrogênio e etanol), sem qualquer pré-tratamento, usando a metodologia de superfície de resposta e concluíram que a concentração máxima de etanol foi de 12,2 g_{DQO}/L de esterco de vaca.

Portanto, a fermentação conjunta de fontes amiláceas, como a apresentada neste estudo, poderia ser uma alternativa para a produção de etanol, principalmente em se considerando que as regiões Norte e Nordeste precisam encontrar outras matérias-primas que se adaptem ao clima e solo da região. Sabe-se que em função

do vasto conhecimento agregado às muitas pesquisas empreendidas no Brasil envolvendo a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, atualmente há disponíveis mais de 500 variedades de cana, comparadas com às apenas 10 disponíveis na década de 1970. No entanto, todas essas novas variedades são adaptadas para as regiões Sul e Sudeste, sendo este um fator determinante para que mais de 60% de toda a cana-de-açúcar seja cultivada na região de São Paulo (COMPEÁN; POLENSKE, 2011).

Levando-se em consideração que o preço da matéria-prima é responsável por metade do custo de produção de etanol (JIN et al., 2012), a perspectiva de se utilizar fontes diversas, simultaneamente, poderia desonerar o processo, além da possibilidade de as mesmas poderem ser adquiridas de pequenos agricultores, haja vista que a batata-doce e a mandioca têm sido popularmente cultivadas por agricultores familiares. Isto ocorre por conta de seu baixo custo de produção, e do seu perfil "pró-pobre", uma vez que têm-se demonstrado que essas pequenas culturas, via de regra, são mais eficazes do que sistemas de grande escala (RASMUSSEN et al., 2012). Vinculando-se as mesmas à produção de biocombustíveis, pode-se gerar uma expectativa de real ganho de renda para essas famílias.

E mais, essa alternativa torna-se particularmente viável quando se evocam os atuais conceitos de biorrefinaria, que dizem respeito a um tipo de planta que permita a combinação de materiais para a produção de substâncias químicas, ou produtos de combustível para a geração de energia, incluindo-se aí a produção de biomassa, sua transformação e o seu uso final (NAIK et al., 2010). Com a implantação desse sistema a biomassa amilácea poderia ser utilizada em sua totalidade, agregando-se valor aos subprodutos, o que poderia tornar o processo viável nos âmbitos econômico, ambiental e social.

Mas, para que haja o desenvolvimento de sistemas inovadores e de alto rendimento, e otimizado o balanço energético, o incremento da cadeia produtiva de fontes alternativas à cana-de-açúcar requer o desenvolvimento, também, do desempenho das leveduras que atuam na fermentação alcoólica. Como exemplo,

pode-se relacionar o trabalho de Basso et al. (2008), que relataram os excelentes resultados obtidos num programa de seleção de leveduras por 12 anos, *in situ* em usinas de bioetanol no Brasil, com o intuito de isolar estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* adequadas para a fermentação de açúcar de caldo de cana e melado, com reciclo de células, tendo-se em conta que a biodiversidade de leveduras encontradas em ambientes de grande destilaria poderia ser naturalmente resistente as tensões e estresses locais.

Outras metodologias têm sido desenvolvidas para diminuição do gasto energético na conversão dessas matérias-primas alternativas em etanol, como relataram Nitayavardhana et al. (2010) ao verificarem os efeitos do ultrassom sobre os rendimentos de etanol de "chips" de mandioca, mostrando que maiores rendimentos advinham diretamente relacionados aos tempos de sonicação, com produção de etanol 2,7 vezes maior do que nas amostra que não receberam o ultrassom. Também Boonnop et al. (2009), testando a mandioca brava, que geralmente não pode ser usada *in natura* na alimentação humana e animal, viram que para a produção de etanol esse material não acarretava problemas, pois demonstraram que após fermentação da mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* os níveis de cianeto residual tornaram-se notavelmente menores, sugerindo que esta levedura também era capaz de utilizar glicosídeos cianogênicos, e os produtos de sua degradação, como substrato.

Em geral, conforme explicado por Ziska et al. (2009), a combinação de alta produção de bioetanol, combinado com baixos custos, potencializou o uso dessas espécies de raízes e tubérculos para esse bioprocessos. Outros autores, como Nguyen et al. (2006), destacaram que o etanol obtido a partir de biomassa traz vantagens como: a redução das importações de petróleo e economia de divisas, a redução dos encargos da dívida externa, a diminuição dos impactos do aquecimento global e a redução de algumas emissões de gases poluentes, a melhoria do desenvolvimento tecnológico, estimulam a produção nacional agrícola e a expansão dos mercados de *commodities* agrícolas, além da estabilização financeira das condições de vida dos agricultores.

Um estudo de Hira (2011) apontou que o nível do comércio internacional de biocombustíveis atualmente é altamente limitado quando comparado ao seu potencial. Frente à atual aceleração dos preços dos combustíveis fósseis, os biocombustíveis não só têm substituído a gasolina, como também têm influenciado na redução de emissões de gases do efeito estufa. Portanto, hoje, não é uma questão de se saber se haverá um forte mercado mundial de biocombustíveis a partir de biomassas, mas sim dentro de quanto tempo e quem irá se beneficiar com isto.

5. CONCLUSÕES

Foi avaliado o processo de produção de etanol utilizando a batata-doce, o milho e a mandioca, conjuntamente ou em várias combinações, tendo-se gerado as seguintes recomendações para obtenção do maior produção:

- A faixa ótima para se obter o maior rendimento de açúcares redutores ocorreu quando 0,36 ml (0,45 g/Kg_{amido}) de Liquizyme® SC e 10,18 ml(11,71 g/Kg_{amido}) de Spirizyme® Fuel foram aplicados sobre cada kg de amido (base seca);
- A condição que apresentou maior rendimento de etanol na fermentação da mistura (BDI, Ma e Mi) foi com 2,25 % do fermento comercial Fleischmann® liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*), durante 24 horas;
- A mistura das amiláceas (BDI, Ma e Mi), com teor de amido proporcional, produziu o maior volume de etanol, sendo o valor médio de 13301,62 L/ha.

6. REFERÊNCIAS

ABE, J. I.; TAKEDA; Y; HIZUKURI, S. **Action of glucoamylase from Aspergillus niger on phosphorylated substrate**. Biochimica et Biophysica Acta, v.703, p.26–33. 1982.

ABSAR, N.; Z Aidul, I.S.M.; TAKIGAWA, S.; HASHIMOTO, N.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; NODA, T. **Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus**. Food Chemistry, v.112, p. 57–62, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP. **RESOLUÇÃO ANP nº 7**, de 9 fev.2011. **Diário Oficial da União**, 10 de fev. 2011a.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP. **Resolução ANP/MME, nº18**, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União** de 25 mar. 2011b.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução nº 23 de 6 jul. 2010. **Diário Oficial da União** de 07 jul. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Portaria MAPA nº 678, de 31 ago. 2011. **Diário Oficial da União** de 1 set. 2011c.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Boletim Mensal do Monitoramento dos Combustíveis Líquidos Automotivos. Ano 10, Agosto 2011d.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução ANP nº 36, de 6.12.2005 - **Diário Oficial da União** de 7 dez. 2005.

ALTINTAS, M.M., ULGEN, K.O., KIRDAR, B., ONSAN, Z.I., OLIVER, S.G. **Optimal substrate feeding policy for fed-batch cultures of *S. cerevisiae* expressing biofunctional fusion protein displaying amyolytic activities.** Enzyme Microb. Technol., v. 33, p. 262–269, 2003.

AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M.; BUCKERIDGE, M.S. **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais.** Hoehnea, V. 34, p. 425-431, 2007.

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

APAR, K.D.; ÖZBEK, B. **α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis.** Process Biochemistry, v.39, p.1137–1144, 2004a.

APAR, K.D.; ÖZBEK, B. **α -Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process.** Process Biochemistry, v.39, p.1877–1892, 2004b.

APAR, K.D.; ÖZBEK, B. **α -Amylase inactivation during rice starch hydrolysis.** Process Biochemistry, v.40, p.1367–1379, 2005.

APIWATANAPIWAT, W.; MURATA, Y.; KOSUGI, A.; YAMADA, R.; KONDO, A.; ARAI, T.; RUGTHAWORN, P.; MORI, Y. **Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and β -glucosidase.** Appl Microbiol Biotechnol, v. 90, p. 377–384, 2011.

ARAÚJO, N. Q.; CASTRO, H.F.; SALLES FILHO, M.; LEAL, J.L.S.; ESTEVES, A.M.L.; COSTA, F. A.; ARAUJO, I.M.C.; SALLES, N.G. **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol.** (S.L.), 11p. 1978

ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. **Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas.** Anais de Farmácia e Química de São Paulo. v.20, p.307-318, 1980.

ASIEDU J. J. **Processing tropical crops**. A technological approach Pub. Macmillan, London, p. 234 -235, 1989.

ATTHASAMPUNNA, S.; SOMCHAI, P.; EUR-AREE, A.; ARTJARIYASRIPONG, S. **Production of fuel ethanol from cassava**. MIRCENJournal, v. 3, p. 135-142, 1987

BALL, S.G., WAL, M.H.B.J.; VISSER, R.G.F. **Progress in understanding the biosynthesis of amylose**. Trends in Plant Science, v.3, p.462-467, 1998.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3rd ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2007. 480 p.

BASKAR, G.; MUTHUKUMARAN, C.; RENGANATHAN, S. **Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Manihot Esculenta Root Starch by Immobilized α -Amylase Using Response Surface Methodology**. International Journal of Chemical and Biological Engineering, v.1, n.3, 2008.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. DE; OLIVEIRA, A. J. DE; LOPES, M. L. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. FEMS Yeast Res, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

BOKANGA, M. **Biotechnology and cassava processing in Africa**. IITA Research 12: 14-18, 1996.

BOKANGA, M. **Chapter xii cassava: Post-harvest Operations**. 2008. Disponível: <<http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch12.htm>> Acesso em 04 mai. 2011.

BOONNOP, K.; WANAPAT, M.; NONTASO, N.; WANAPAT, S. **Enriching Nutritive Value of Cassava Root by Yeast Fermentation**. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.66, n.5, p.629-633, September/October, 2009.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical Model Building and Response Surfaces**, John Wiley & Sons, New York, NY, 1987.

BP - **Statistical Review of World Energy**. Junho, 2012. Disponível em: <http://www.bp.com/statisticalreview>. Acesso em: 12 fev. 2013.

BRASIL. **Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional 2012 – Ano base 2011**: Resultados Preliminares. Rio de Janeiro: EPE, 2012. 51 p.

BRASIL. **PLANO NACIONAL SOBRE MUDANÇA DO CLIMA – PNMC – BRASIL**. GOVERNO FEDERAL COMITÊ INTERMINISTERIAL SOBRE MUDANÇA DO CLIMA. Decreto nº 6.263, de 21 de novembro de 2007. BRASÍLIA, DEZEMBRO DE 2008.

CARPITA, N.C.; KANABUS, J. **Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay**. *Analytical Biochemistry*, v.161, p.132-139, 1987.

CARVALHO, K. M. **Avaliação da Eficiência do Soro de Leite na Potencialização da Produção Convencional de Etanol a Partir de Três Cultivares Industriais de Mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**. Palmas, 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, 2011.

CASTRO, I. P. M. DE. **Uso do soro de queijo na potencialização da produção convencional de etanol a partir de duas cultivares industriais de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**. Palmas, 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, 2009.

CHEN, X.; KHANN, M. **Explaining the reductions in US corn ethanol processing costs: Testing competing hypotheses**. *Energy Policy*, v. 44, p. 153–159, 2012.

CHEN, Y.; HUANG, S.; TANGA, Z.; CHEN, X.; ZHANG, Z. **Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of alfa-amylase and glucoamylase**. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 272–275, 2011.

CHEOL, Y.; JOHN, F. R. **Reactions of a-amylases with starch granules in aqueous suspension giving products in solution and in a minimum amount of water giving products inside the granule**. *Carbohydrate Research*, v.337, p.1113–1117, 2002.

CHRASIL, J. **Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours**. *Carbohydrate Research*, v.159, p.154-158, 1987.

CHUA, J. W.; FUKUI, N.; WAKABAYASHI, Y.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. **Enzymatic Hydrolysis of Sweet Potato for Energy-Saving Production of Ethanol**. J. Ferment. Technol., v. 62, p. 123-130, 1984.

COLOMBIA, C. **Technology of South Crown China for cassava industrialization**. 2007. Disponível em:
<http://www.clayuca.org/clayucanet/edicion10/presentaciones/china_2007.pdf>
Acesso em 28 abr. 2011.

COLONNA, P., LELOUP, V.; BULEON, A. **Limiting factors of starch hydrolysis**. European Journal of Clinical Nutrition, v.46, p. 17–32, 1992.

COMPEÁN, R. G.; POLENSKE, K. R. **Antagonistic bioenergies: Technological divergence of the ethanol industry in Brazil**. Energy Policy, v. 39, p. 6951–6961, 2011.

CSTRU (Cassava and Starch Technology Research Unit). **Outlook of raw materials for ethanol industry in Thailand**. 2004. Disponível em: <www.cassava.org/News/biofuel2004/Poster_ethanol2.pdf>.

DAI, D.; HU, Z.; PU, G.; LI, H.; WANG, C. **Energy efficiency and potentials of cassava fuel ethanol in Guangxi region of China**. Energy Conversion and Management, v. 47, p. 1686–1699, 2006.

DARNOKO, D., CHERYAN, M.; ARTZ, W. E. **Saccharification of cassava starch in an ultrafiltration reactor**. Enzyme Microbial Technology, v.11, 1989.

DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric method of determination of sugars and related substances**. Analytical Chemistry, v.28, p.350-355, 1956.

DUKE, J.A. **Manihot esculenta Crantz. Handbook of energy crops**. 1983. Disponível em:
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Manihot_esculenta.html> Acesso em: 08 jun. 2011.

DUVERNAY, W. H. **Conversion of Industrial Sweet potatoes for the Production of Ethanol**. Faculty of North Carolina State University, Degree of Master of Science. Biological and Agricultural Engineering. Raleigh, North Carolina, 2008.

ERDEI, B.; BARTA, Z.; SIPOS, B.; RÉCZEY, K.; GALBE, M. e ZACCHI, G. **Research Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal**. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 16, 2010

ESPÍNDOLA, A. A. **Processo de Certificação do Etanol Brasileiro**. *Revista de Ciências Gerenciais*. v.13, n.17, p.113-130, 2009.

EVANS, A.; THOMPSON, D.B. **Resistance to α -amylase digestion in four native high-amylose maize starches**. *Cereal Chemistry*, v.81, p.31–37, 2004.

FAO. **Starch market adds value to cassava**. United Nations Food and Agricultural Organization; 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/magazine/0610sp1.htm>>. Acesso em 21 março de 2013.

FAO—Food and Agriculture Organization of the United Nations: essential documents, statistics, maps and multimedia resources. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em:17 fev. 2013.

GALBE, M., ZACCHI, G. **A review of the production of ethanol from softwood**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (6), p. 618–628, 2002.

GALLANT, D. J., BOUCHET, B., BULEON, A.; PEREZ, S. **Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation**. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.46, 1992.

GÁS BRASIL. **Etanol: Economista defende pequenas usinas para baixar preços e suprir mercados brasileiro e internacional**. 01 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.gasbrasil.com.br/noticia/noticia.asp?NotCodNot=48238>>. Acesso em: 12 jun. 2011.

GONÇALVES NETO, Á. C.; MALUF, W. R.; GOMES, L. AN. A.; GONÇALVES, R. J. DE S.; SILVA, V. DE F.; LASMAR, A. **Aptidões de genótipos de batata- doce para consumo humano, produção de etanol e alimentação animal**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.11, p.1513-1520, nov. 2011.

GOVINDASAMY, S.; CAMPANELLA, H.; OATES, C. G. **Enzymatic Hydrolysis and Saccharification Optimisation of Sago Starch in a Win-screw Extruder**. Journal of Food Engineering, v.32, p.427-446, 1997.

GRANT, L. A.; OSTENSON, A. M.; RAYAS-DUARTE, P. **Determination of Amylose and Amylopectin of Wheat Starch Using High Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC)**. Cereal Chemistry, v.79, n.6, p.771–773, 2002.

HETTINGA, W.G., JUNGINGER, H.M., DEKKER, S.C., HOOGWIJK, M., MCALOON, A.J., HICKS, K.B. **Understanding the reductions in US corn ethanol production costs: an experience curve approach**. Energy Policy, v. 37, p. 190–203, 2009.

HIRA, A. **Sugar rush: Prospects For a global ethanol market**. Energy Policy, v. 39, p. 6925–6935, 2011.

HIZUKURI, S., TABATA, S.; NIKUNI, Z. **Studies on starch phosphate: Part 1. Estimation of glucose 6-phosphate residues in starch and the presence of tuber bound phosphate(s)**. Starch–Stärke, v.22, p.338–343, 1970.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020. Versão eletrônica, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em 10 jan. 2013.

IOWA CORN. **Corn Usage in the U.S. from 2011 - 2012**. USDA & ProExporter Network: August 10, 2012. Disponível em: <http://www.iowacorn.org/en/corn_use_education/production_and_use/>. Acesso em: 18 fev. 2013.

JACOBS, H.; MISCHENKO, N.; KOCH, M.; EERLINGEN, R.; DELCOUR, J.; REYNAERS, H. **Evaluation of impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: A differential scanning calorimetry and small angle X-ray scattering study**. Carbohydrate Research, p.1-10, 1998.

JARVIS, C. E.; WALKER, R. L. **Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.63, p.53-57, 1993.

JEKAYINFA, S.O.; OLAJIDE, J.O. **Analysis of energy usage in the production of three selected cassava-based foods in Nigeria.** J Food Eng. v. 82:2, p. 17–26, 2007.

JERMYN, M. A. **A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses.** Nature, v.177, p.38-39, 1956.

JIA, X.F., YING, Y.M., 2005. **The analysis of wastewater treatment techniques in alcohol production.** Journal of Henan Institute of Science and Technology, v. 33, n. 1, p. 78–80 (in Chinese). Citado por: YANG, Q., CHEN, G.Q., Greenhouse gas emissions of corn–ethanol production in China. Ecol. Model. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.011>>.

JIN, Y.; FANG, Y.; ZHANG, G.; ZHOU, L.; ZHAO, H. **Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages.** Acta Oecologica, v. 44, p. 33 e 37, 2012.

JONES, A.; HAMILTON, M. G.; DUKES, P. D. **Sweet Potato Cultivars for Ethanol Production,** Proceedings of the Third Annual Solar Biomass Workshop, Atlanta, GA, April 26--28, p 195-198, 1983.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, D.P.F. **Alcohol Fermentation by Yeasts: The Effect of Environmental and other Variables.** Process Biochemistry, p. 42-49, 1981.

JUMP, J. A; ZAROW, A. I.; STARK, W. H. **Dehydrated Sweet Potatoes for Ethanol Production.** Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 36. No. 12. pg. 1138-1140. Dez.1944.

KIM, J.C.; KONG, B.W.; KIM, M.J.; LEE, S.H. **Amylolytic Hydrolysis of Native Starch Granules Affected by Granule Surface Area.** Journal of Food Science, v.73, n.9, p.621-624, 2008.

KNUTSON, C.A. **A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches.** Cereal Chemistry, n.63, p.89-92, 1986.

KONG, B.W.; KIM, J.I.; KIM, M.J.; Kim, J.C. **Porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area.** Biotechnology Progress, v.19, p.1162–6, 2003.

KOUTINAS, A.; BELAFI-BAKO, K.; KABIRI-BADR, A; TO Â TH, A.; GUBICZA, L. & WEBB, C.. **Hydrolysis of Starch by an Enzyme Complex from Fermentation by *Aspergillus awamori*. Part C.** Institution of Chemical Engineers, v.79, 2001.

KUNAMNENI, A.; SINGH, S. **Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production.** Biochemical Engineering Journal, v.27, p.179–190, 2005.

KURAKAKE, M., TACHIBANA, Y., MASAKI, K.; KOMAKI, T. **Adsorption of alpha-amylase on heat–moisture treated starch.** Journal of Cereal Science, v.23, p.163–168, 1996.

LÁZARI, T. M. DE. **AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE CLONES DE BATATA-DOCE, SUAS CORRELAÇÕES E IMPLICAÇÕES NO RENDIMENTO DE ETANOL.** Dissertação - mestrado em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins- título de mestre. 2011.

LELOUP, V.M.; COLONNA, P.; RING, S.G. **α -amylase adsorption on starch crystallites.** Biotechnology Bioengineering, v.38, p.127–34, 1991.

LEWANDOWICZ, G.; SORAL-SMIETANA, M. **Starch modification by iterated syneresis.** Carbohydrate Polymers, v.56, p.403-413, 2004.

LI, H.; CHI, Z.; DUAN, X.; WANG, L.; SHENG, J.; WU, L. **Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme.** Process Biochemistry, 42, 462–465. 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) **Biotechnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LIN, H-J.; XIAN, L.; ZHANG, Q -J.; LUO, X -M.; XU, Q -S.; YANG, Q.; DUAN, C -J.; LIU, J -L.; TANG, J -L.; FENG, J -X. **Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol.** J Ind Microbiol Biotechnol, v. 38, p. 733–742, 2011.

LINKO, P., HAKULIN, S.; LINKO, Y. Y. **Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol.** Journal of Cereal Science, v.1, p.275-284, 1983.

LIU, Q. **A Study of Enzymatic Hydrolysis of Starch in Potato Pulp.** Journal of Food Science, v.67, n.6, p.2113-2117, 2002.

LOPES, C.H. **Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira.** Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Alcool, 32p, 1987.

MA, Y.; CAI, C.; WANG, J.; SUN, D-W. **Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetics.** Journal of Food Engineering, v.73, p.297–303, 2006.

MABEE, W.. **Economic Environment and Social Impact of 2nd Generation Biofuels in Canada.** BIOCAP Research Integration Program, 2006.

MACEDO, I. C. **GREENHOUSE GAS EMISSIONS AND ENERGY BALANCES IN BIO-ETHANOL PRODUCTION AND UTILIZATION IN BRAZIL (1996).** Biomass and Bioenergy, v.14, n. 1, p. 77-81, 1998.

MACEDO, I.D. **Converting biomass to liquid fuels: making ethanol from sugar cane in Brazil.** 1995. In: Goldemberg J, Johansson TB (eds.). Energy as an instrument for socio-economic development. UNDP, New York: 107-112

MANIKANDAN, K.; VIRUTHAGIRI, T. **Kinetic and Optimization Studies on Ethanol Production from Corn Flour.** International Journal of Chemical and Biological Engineering, v. 3:2, 2010.

MARCHAL, L. M., JONKERS, J., FRANKE, G. T.; DEGOOIJER, C. D.; TRAMPER, J. **The effect of process conditions on the α -amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch: An experimental design approach.** Biotechnology and Bioengineering, v.62, p.348–357, 1999.

MARSHALL, J. J.; WHELAN, W. J. **Incomplete conversion of glycogen and starch by crystalline amyloglucosidase and its importance in the determination of amylaceous polymers.** Federation of European Biochemical Societies Letters, v.9, p.85–88, 1970.

MARTÍN, J.C.; LÓPEZ, E. **Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa-amilasa.** Revista Colombiana de Química, v.38, n.3, 2009.

MARTINEZ, C.; PRODOLLIET, J. **Determination of amylose in cereal and non-cereal starches by a colorimetric assay: Collaborative study.** Starch-Stärke, v.48, p.81-85, 1996.

MARTINS, E. C. A. **Variabilidade fenotípica e divergência genética em genótipos de batata doce no Estado do Tocantins.** Palmas, 2010. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Universidade Federal do Tocantins, 2010.

MATSUOKA, H.; KOKA, Y.; UEDA, S. **Alcoholic Fermentation of Sweet Potato without Cooking.** J. Ferment. Technol. v. 60, p. 599-602, 1982.

MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V.; OWENS, H.S. **Determination of starch and amylose in vegetables.** Application to peas. Analytical Chemistry, v.22, p.1156-1158, 1950.

MCKENDRY P. **Energy production from biomass (part 1): overview of biomass.** Bioresour Technol, v. 83, p. 37–46, 2002.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Anal. Chem. 31, 426–428, 1959.

MISHRA, G. S.; YEH, S. **Life Cycle Water Consumption and Withdrawal Requirements of Ethanol from Corn Grain and Residues.** Environ. Sci. Technol. v. 45, p. 4563–4569, 2011.

MITSUIKI, S.; MUKAE, K.; SAKAI, M. GOTO, M.; HAYASHIDA, S.; FURUKAWA, K. **Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various Bacillus strains.** Enzyme and Microbial Technology, v.37, p.410-416, 2005.

MIYAKE, B. K. **ON THE NATURE OF THE SUGARS FOUND IN THE TUBERS OF SWEET POTATOES.** Received for publication: Abril, 1915. Downloaded from www.jbc.org at CAPES/MEC - UFPI. Maio, 2011.

MME- Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis **BOLETIM MENSAL DOS COMBUSTÍVEIS RENOVÁVEIS.** Edição N° 37. Janeiro, 2011.

MOJOVIC, L.; NIKOLIC, S.; RAKIN, M.; VUKASINOVIC, M. **Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates.** Fuel, v. 85, p.1750–1755, 2006.

MORIYAMA, T.; IKEDA, H. **Hydrolases acting on glycosidic bonds: chromatographic and electrophoretic separations.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v.684, p.210–216, 1996.

MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G. et al. **Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal.** Plant Physiology, v.122, p.989-997, 2000.

NAIK, S.N.; GOUD, V. V.; ROUT, P.K.; DALAI, A. K. **Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 578–597, 2010.

National Renewable Energy Laboratory - NREL. **Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. A Joint Study Sponsored by: U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Energy.** Out, 2000.

NEBESNY, E.; ROSICKA, J.; TKACZYK, M. **Effect of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Starch on Amylose-Lipid Complexes Stability.** Starch/Stärke, v. 54, p. 603–608, 2002.

NEBESNY, E.; ROSICKA, J.; TKACZYK, M. **Influence of Conditions of Maize Starch Enzymatic Hydrolysis on Physicochemical Properties of Glucose Syrups.** Starch-Stärke. v.56, p.132–137, 2004.

NELSON, O.; PAN, D. **Starch synthesis in maize endosperms.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.46, p.475-496, 1995.

NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. **Sistema agroindustrial da cana: cenários e agenda estratégica.** Economia Aplicada. São Paulo, v.11, n.4, p.587-604, 2007.

NGUYEN, T. L. T.; GHEEWALA, S. H.; GARIVAIT, S. **Energy balance and GHG-abatement cost of cassava utilization for fuel ethanol in Thailand.** Energy Policy, v. 35, p. 4585–4596, 2007a.

NGUYEN, T. L. T.; GHEEWALA, S. H.; GARIVAIT, S. **Full Chain Energy Analysis of Fuel Ethanol from Cassava in Thailand.** Environ. Sci. Technol., v. 41, n. 11, p. 4135–4142, 2007b.

NGUYEN, T.L.T.; GHEEWALA, S.H.; GARIVAIT, S. **Life cycle cost analysis of fuel ethanol produced from cassava in Thailand.** 2006. Disponível em: <<http://www.kmutt.ac.th/see1/cd/file/C-024.pdf>>. Acesso em 10 jun. 2011.

NIKOLIC´, S.; MOJOVIC´, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; NEDOVIC´, V. **Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus.** J Chem Technol Biotechnol; v. 84, p. 497–503, 2009.

NITAYAVARDHANA, S.; SHRESTHA, P.; RASMUSSEN, M. L.; LAMSAL, B. P.; LEEUWEN, J. (HANS) VAN; KHANAL, S. K. **Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants.** Bioresource Technology, v. 101, p. 2741–2747, 2010.

NUWAMANYA, E.; CHIWONA-KARLTUN, L.; KAWUKI, R. S.; BAGUMA, Y. **Bio-Ethanol Production from Non-Food Parts of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** AMBIO, v. 41, p. 262–270, 2012.

NWEKE, F.I. **Cassava processing in sub-Saharan Africa: Implications for expanding cassava production.** IITA Research, v. 12, p. 7-14, 1996.

O'HAIR, S.K. **Tropical root and tuber crops.** 1995. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/V1-424.html#Cassava>>. Acesso em: 30 maio de 2011.

OHIMAIN, E. I. **The benefits and potential impacts of household cooking fuel substitution with bio-ethanol produced from cassava feedstock in Nigeria.** Energy for Sustainable Development , v.16, p. 352–362, 2012.

OHIMAIN, E. I. **The benefits and potential impacts of household cooking fuel substitution with bio-ethanol produced from cassava feedstock in Nigeria.** Energy for Sustainable Development, v. 16, p. 352–362, 2012.

OZBAY, N.; PUTUN, A.E.; UZUN, B.B.; PUTUN, E. **Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake.** Renew Energy; v. 24, p. 615–25, 2001.

PATZEK, T. W. **Thermodynamics of the Corn-Ethanol Biofuel Cycle.** Critical Reviews in Plant Sciences, v. 23, n. 6, p. 519–567, 2004.

PAVLAK, M.C.M.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S.C. E PAULILLO, S.C.L. **Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.** Quim. Nova, Vol. 34, n. 1, p. 82-86, 2011.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M.R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. **Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs.** Bioresource Technology, v. 101, p. 7856–7863, 2010.

PHILLIPS, T.P.; TAYLOR, D.S.; SANNI, L.; AKORODA, M.O. **A cassava industrial revolution in Nigeria: The potential for a new industrial crop.** 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5548e/y5548e00.htm>> Acesso em 12 jun. 2011.

PORDESIMO, L. O.; EDENS, W.C.; SOKHANSANJ, S. **Distribution of aboveground biomass in corn stover.** Biomass and Bioenergy, v. 26, n. 4, 2004.

POSTERNAK, T. **On the phosphorus of potato starch.** Journal of Biological Chemistry, v.188, p.317–325, 1951.

PURCHER, G.W., LEAVENWORTH, C.S.; VICKERY, H.B. **Determination of starch in plant tissue.** Analytical Chemistry, v.20, p.850-853, 1948.

RASMUSSEN, L. V.; RASMUSSEN, K.; BIRCH-THOMSEN, T.; KRISTENSEN, S. B. P.; TRAORE, O. **The effect of cassava-based bioethanol production on above-ground carbon stocks: A case study from Southern Mali.** Energy Policy, v. 41, p. 575–583, 2012.

RENDLEMAN, J.A. **Hydrolytic action of α -amylase on high amylose starch of low molecular mass.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v.31, p.171–178, 2000.

Renewable Fuels Association –RFA. 2007. **Industry statistics. Renewable Fuels Association.** Washington, DC. Disponível em: <www.ethanolrfa.org>. Acesso em: 12 jun. 2011.

Renewable Fuels Association –RFA. **Ethanol industry statistics: Historic U.S. Fuel Ethanol Production.** Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>>. Acesso em 08 jun. 2011.

RICO, J. A. P.; MERCEDES, S. S.P.; SAUER, I. L. **Genesis and consolidation of the Brazilian bioethanol: A review of policies and incentive mechanisms.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 1874–1887, 2010.

RUSSO, M.A.L.; TRUSS, R.; HALLEY, P.J. **The enzymatic hydrolysis of starch-based PVOH and polyol plasticised blends.** Carbohydrate Polymers, v.77, p.442–448, 2009.

SALIERI, G.; VINCI, G.; ANTONELLI, M.L. **Microcalorimetric study of the enzymatic hydrolysis of starch: an α -amylase catalyzed reaction.** Analytica Chimica Acta, v.300, p.287-292, 1995.

SALLA, D. A. **ANÁLISE ENERGÉTICA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ETANOL DE MANDIOCA, CANA-DE-AÇÚCAR E MILHO.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. BOTUCATU – SP. Maio, 2008.

SANTA-MARIA, M.; PECOTA, K. V.; YENCHO, C. G. ALLEN, G.; SOSINSKI, B. **Rapid shoot regeneration in industrial ‘high starch’ sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes.** Plant Cell Tiss Organ Cult, v. 97, p. 109–117, 2009.

SARASWATI, P; JOHNSTON, M; CONVETRY, R; HOLTUM, J. **Identification of drought tolerant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars.** In:

Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 2004. Disponível em: <http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/1/1/1400_saraswatip.htm>. Acesso em: 18 fev. 2013.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M. MIKAMI, B. **Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules.** Process Biochemistry, v.35, p.711–715, 2000.

SERRA, T.; ZILBERMAN, D.; GIL, J. M.; GOODWIN, B. K. **Nonlinearities in the US corn-ethanol-oil price system.** Association Annual Meeting, Orlando, FL, p. 27-29, jul., 2008.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J. A.; WANG, M. **The Energy Balance of Corn Ethanol: An Update.** U.S. Department of Agriculture, Office of the Chief Economist, Office of Energy Policy and New Uses. Agricultural Economic Report No. 814. July, 2002.

SHARIFFA, Y.N.; KARIM, A.A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I.S.M. **Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature.** Food Hydrocolloids, v.23, p.434– 440, 2009.

SILVA, E.P.S. **Especificação e Certificação do Etanol Brasileiro: A Contribuição do Paradigma Multicritério.** 114p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Economia e Finanças IBMEC. Rio de Janeiro - RJ. 2008.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. **de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78, 2002.b

SILVA, F. M. **Avaliação e seleção de clones de batata doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam) quanto a produtividade e capacidade de bioconversão de amido em etanol.** Dissertação de Mestrado.Universidade Federal do Tocantins –UFT. Palmas-Tocantins, 2010a.

SILVA, J. O. V. **Comparação entre metodologias visando obtenção de maior rendimento de etanol a partir da batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], em Palmas-TO.** Dissertação de Mestrado.Universidade Federal do Tocantins –UFT. Palmas- Tocantins, 2010b.

SILVEIRA, M.A. **Batata- doce: uma nova alternativa para a produção de etanol.** In: Instituto Euvaldo Lodi . Álcool combustível. Brasília: IEL, p.109-122. 2008.

SOMOGY, M. **Determination of blood sugar.** Journal of Biological Chemistry, Bethesda, n. 160, p. 69 - 73, 1945.

SOUZA, C. M.; QUEIROZ, L. A. **Flocculation and fermentation capacity of strains of *Saccharomyces* stored at Mycotheca–URM I.** Boletim Micológico, v.10, p. 89-95, 1995.

SRICHUWONG, S.; ORIKASA, T.; MATSUKI, J.; SHIINA, T.; KOBAYASHI, T.; TOKUYASU, K. **Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production.** Biomass and bioenergy, v. 39, p. 120 e 127, 2012.

STEINER, E.T.; GUTHRIE, J.D. **Determination of starch in sweet potato products and other plant materials.** Industrial & Engineering Chemistry, v.16, p.736-739, 1944.

TABATA, S.; HIZUKURI, S. **Studies on starch phosphate, Part-2. Isolation of glucose-3-phosphate and maltose phosphate by acid hydrolysis of potato.** Starch-Strke, v.23, p.267–272, 1971.

TAKEDA, Y., HIZUKURI, S., SUETAKE, M. **Actions of porcine pancreatic and *Bacillus subtilis* α -amylases and *Aspergillus niger* glucoamylase on phosphorylated (1-6)-D-glucan.** Biochimica et Biophysica Acta, v.749, p.302–311, 1983.

TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. **Location of phosphate groups in potato amylopectin.** Carbohydrate Research, v.102, p.321–327, 1982.

TAYLOR, R. D.; MATTSON; J. W.; ANDINO, J.; KOO, W. W. **Ethanol's Impact on the U.S. Corn Industry.** Center for Agricultural Policy and Trade Studies. Department of Agribusiness and Applied Economics. North Dakota State University. Fargo, North Dakota, 2006.

TESTER, R. F.; SOMMERVILLE, M. D. **Swelling and Enzymatic Hydrolysis of Starch in Low Water Systems.** Journal of Cereal Science, v.33, p.193–203, 2000.

TESTER, R.; KAKALAS, J.; QI, X. **Starch–composition, fine structure and architecture.** Journal of Cereal Science, p.151-165, 2004.

TESTER, R.F., QI, X. **Molecular basis of the gelatinisation and swelling characteristics of waxy barley starches grown in the same location during the same season. Part I. Composition and alpha-glucan fine structure.** Journal of Cereal Science, v.39, p.47–56, 2004.

TESTER, R.F.; KARKALAS, X. QI, J. **Hydrolysis of native starches with amylases.** Animal Feed Science and Technology, v.130, p.39–54, 2006.

THOMAS, D.J., ATWELL, W.A. **Starches: practical guides for the food industry.** Minnesota: Eagan Press Handbook Series, 94p,1999.

THUMÉ, M. A. **Produtividade e absorção de nutrientes de três cultivares de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] selecionadas para a produção de etanol, em função de diferentes doses de N, P e K aplicados no solo.** 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins; Coordenação de Pós-Graduação em Agroenergia, 2011.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A. **Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*.** International Journal of Food Microbiology, v. 80, p. 47-53, 2003.

TORRES, L. M. **Caracterização dos Parâmetros Técnicos do Processo de Fabricação de Aguardente a partir de Gengibre.** 120 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Coordenação de Pós-Graduação em Agronomia, 2009.

TRIANA, C. A. R. **Energetics of Brazilian ethanol: Comparison between assessment approaches.** Energy Policy, v. 39, p. 4605–4613, 2011.

U.S. Environmental Protection Agency – EPA. **EPA Finalizes Regulations for the National Renewable Fuel Standard Program for 2010 and Beyond.** Office of Transportation and Air Quality. February, 2010a.

U.S. Environmental Protection Agency – EPA. **Handbook for Handling, Storing, and Dispensing E85.** July, 2010b.

U.S.D.A, Agriculture Research Service, **Sweet potato out-yields corn in ethanol production study**. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

VAN DEN BRINK, J.; AKEROYD, M.; VAN DER HOEVEN, R.; PRONK, J. T.; WINDE, J. H. de; DARAN-LAPUJADE, P. **Energetic limits to metabolic flexibility: responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose–galactose transitions**. Microbiology, v. 155, p. 1340–1350, 2009.

VAN DER VEEN, M.E.; VEELAERT, S.; VAN DER GOOT, A.J.; BOOM, R.M. **Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design**. Journal of Food Engineering, v.75, p.178–186, 2006.

VAN DIJKEN, J. R.; WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T. **Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 63, p. 343-352, 1993.

VAN DIJKEN, J.P., WESTHUIS, R.A.; PRONK, J.T. **Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts**. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 63, p. 343–352, 1993.

VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; DELCOUR, J.A. **An X-ray study of hydrothermally treated potato starch**. Carbohydrate Polymers, v.64, p.364–375, 2006.

WANG, F.K., WANG, S.G., LI, X.P. **Economic Handbook for Technologies of Industrial Wastewater and Municipal Wastewater Treatment**. Tsinghua University Press, Beijing (in Chinese), 1992. Citado por: YANG, Q., CHEN, G.Q., Greenhouse gas emissions of corn–ethanol production in China. Ecol. Model. 2012.

WANG, W. **Cassava production for industrial utilization in China – Present and future perspectives**. 2002. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/asia_cassava/pdf/proceedings_workshop_02/33.pdf> Acesso em 20 abr. 2011.

WU, Y. V.; BAGBY, M. O. **Recovery of Protein-Rich Byproducts from Sweet Potato Stillage following Alcohol Distillation**. J. Agric. Food Chern., v. 35, p. 321-325, 1987.

WYMAN, C.E., 2007. **What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol.** Trends Biotechnol. 25 (4), 153–157.

YANG, H.; CHEN, L.; YAN, Z.; WANG, H. **Emergy analysis of cassava-based fuel ethanol in China.** Biomass and Bioenergy, v. 35, p. 581 e 589, 2011.

YANG, Q., CHEN, G.Q., **Greenhouse gas emissions of corn–ethanol production in China.** Ecol. Model. 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.011>>.

YANG, Y.; BAE, J.; KIM, J.; SUH, S. **Replacing Gasoline with Corn Ethanol Results in Significant Environmental Problem-Shifting.** Environ. Sci. Technol., v. 46, p. 3671–3678, 2012.

YCADI, **Yearbook of China Alcoholic Drinks Industry.** China Light Industry Press, Beijing. 2003.

YINGLING, B.; LI, C.; HONGLIN, W.; XIWEN, Y.; ZONGCHENG Y. **Multi-objective optimization of bioethanol production during cold enzyme starch hydrolysis in very high gravity cassava mash.** Bioresource Technology, v.102, p.8077–8084, 2011.

YU, B.; ZHANG, F.; ZHENG, Y.; WANG, P. **Alcohol Fermentation From the Mash of Dried Sweet Potato with its Dregs Using Immobilised Yeast.** Process Biochemisrry Vol. 3 1, No. 1, pp. 1-6, 1996.

YUN, S.-H.; MATHESON, N. K. **Estimation of amylose content of starches after precipitation of amylopectin by concanavalin-A.** Starch-Stärke, v.42, p.302-305, 1990.

ZHANG, L.; CHEN, Q.; JIN, Y.; XUE, H.; GUAN, J.; WANG, Z. E ZHAO, H. **Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweetpotato at very high gravity (VHG).** Fuel Processing Technology, v. 91. p. 1845–1850, 2010a.

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN, M.; JIN, Y.; GAO, X.; CHEN, Q.; GUAN, J. E WANG, Z. **Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from**

viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4573–4579, 2011.

ZHANG, P.; CHEN, C.; SHEN, Y.; DING, T.; MAC, D.; HUA, Z.; SUN, D.; **Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production.** *Bioresource Technology*, v. 128, p. 835–838, 2013.

ZHANG, Q-H.; LU, X.; TANG, L.; MAO, Z-G.; ZHANG, J-H.; ZHANG, H-J.; SUN, F-B. **A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 179, p. 635–641, 2010b.

ZHANG, T.; OATES, C. G. **Relationship between alpha-amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches.** *Food Chemistry*, v. 65, n. 2, p.157-163, 1999.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TORBET, H. A.; SICHER, R. **An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland.** *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p.1503 – 1508, 2009.

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

ANEXOS

ANEXO A - Cromatogramas dos açúcares solúveis das matérias-primas

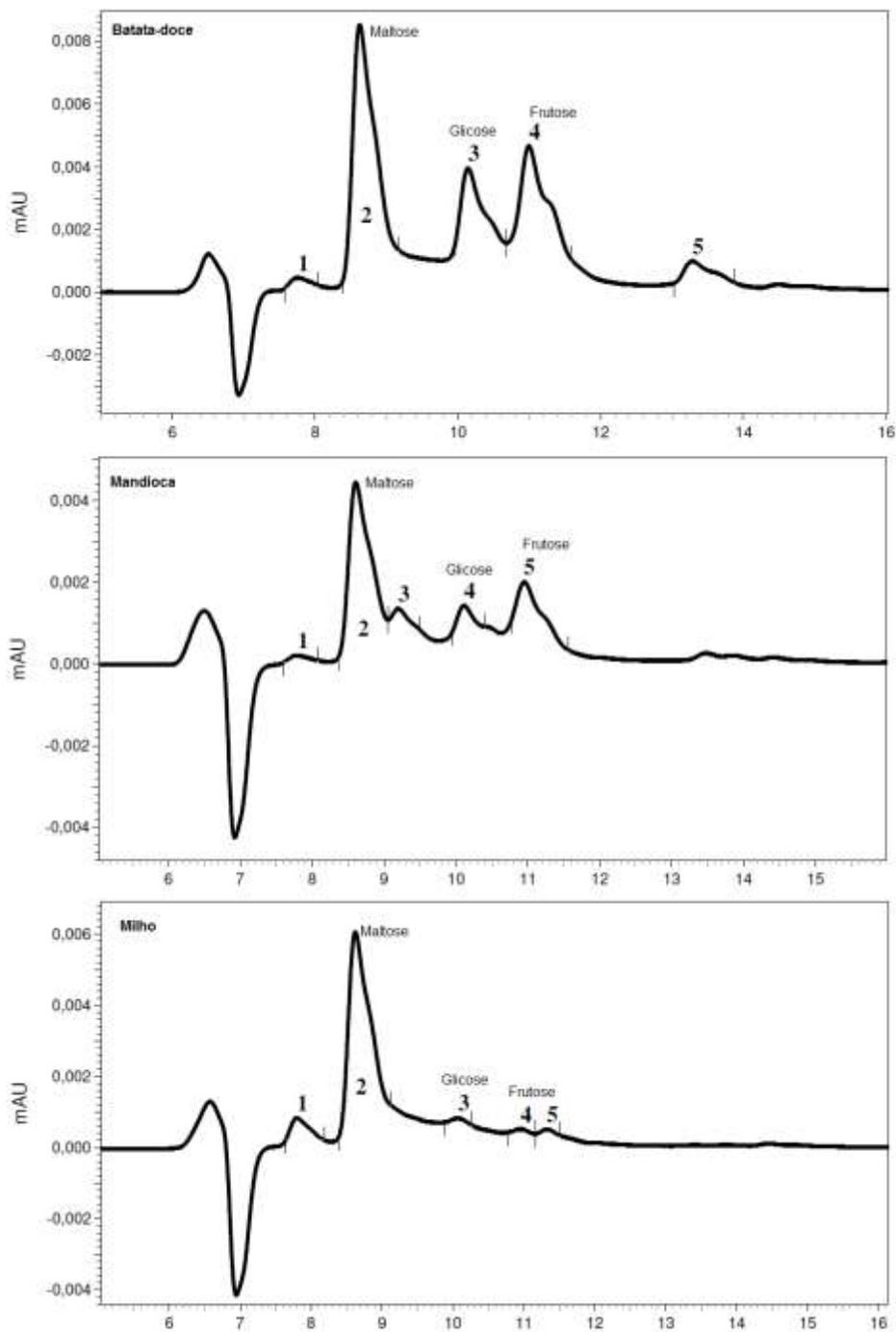


Figura A.1: Cromatograma, obtido por CLAE, das amostras das extrações com etanol 80% (Item 4.2.2) da batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C

ANEXO B- Cromatogramas utilizado na Metodologia de determinação do Amido

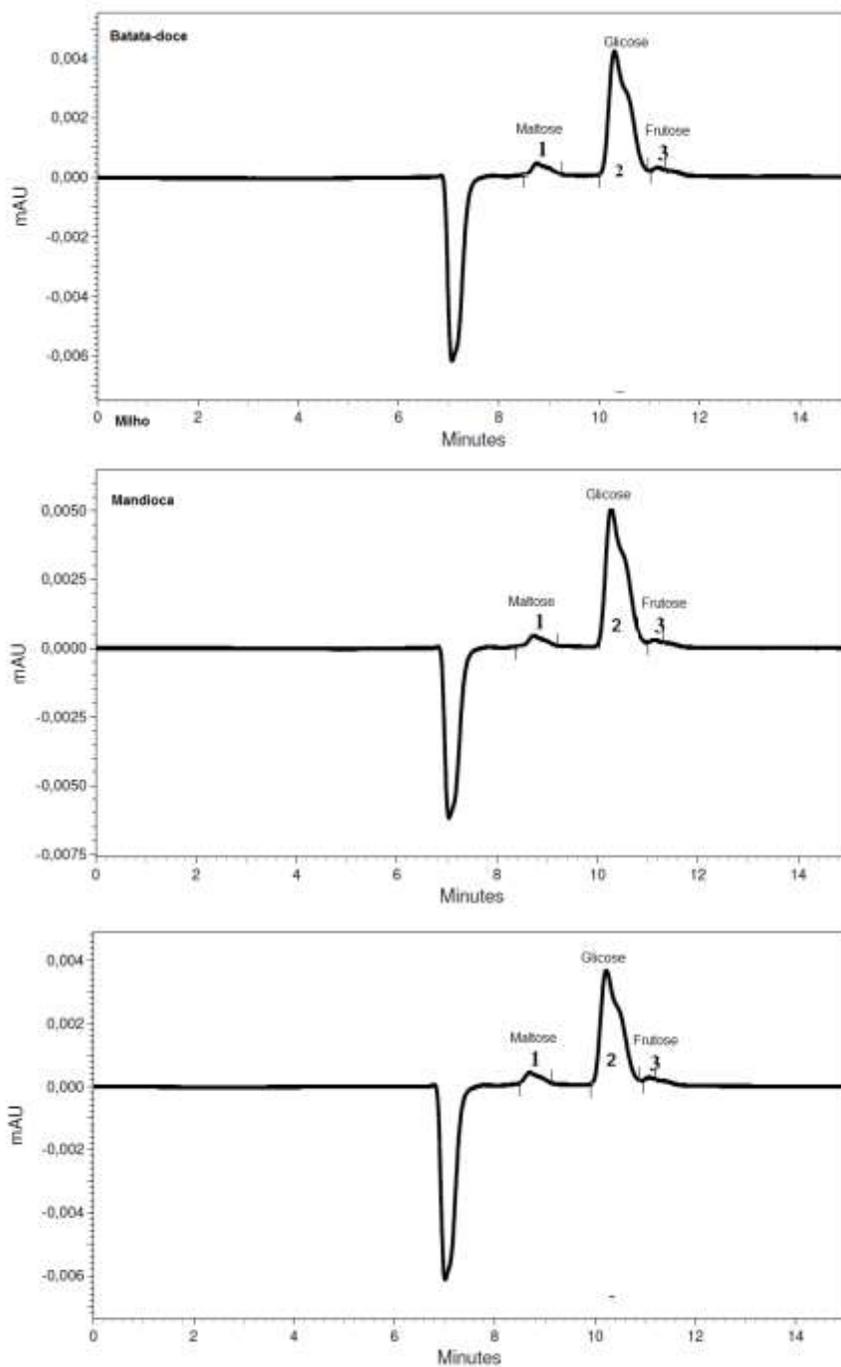


Figura B.1: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das amostras usadas na quantificação dos teores dos açúcares totais, pelo método da hidrólise enzimática (Item 4.2.3) da batata-doce, mandioca e milho. Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C

ANEXO C- Cromatogramas das diferentes combinações das matérias-primas utilizadas no Ensaio 3

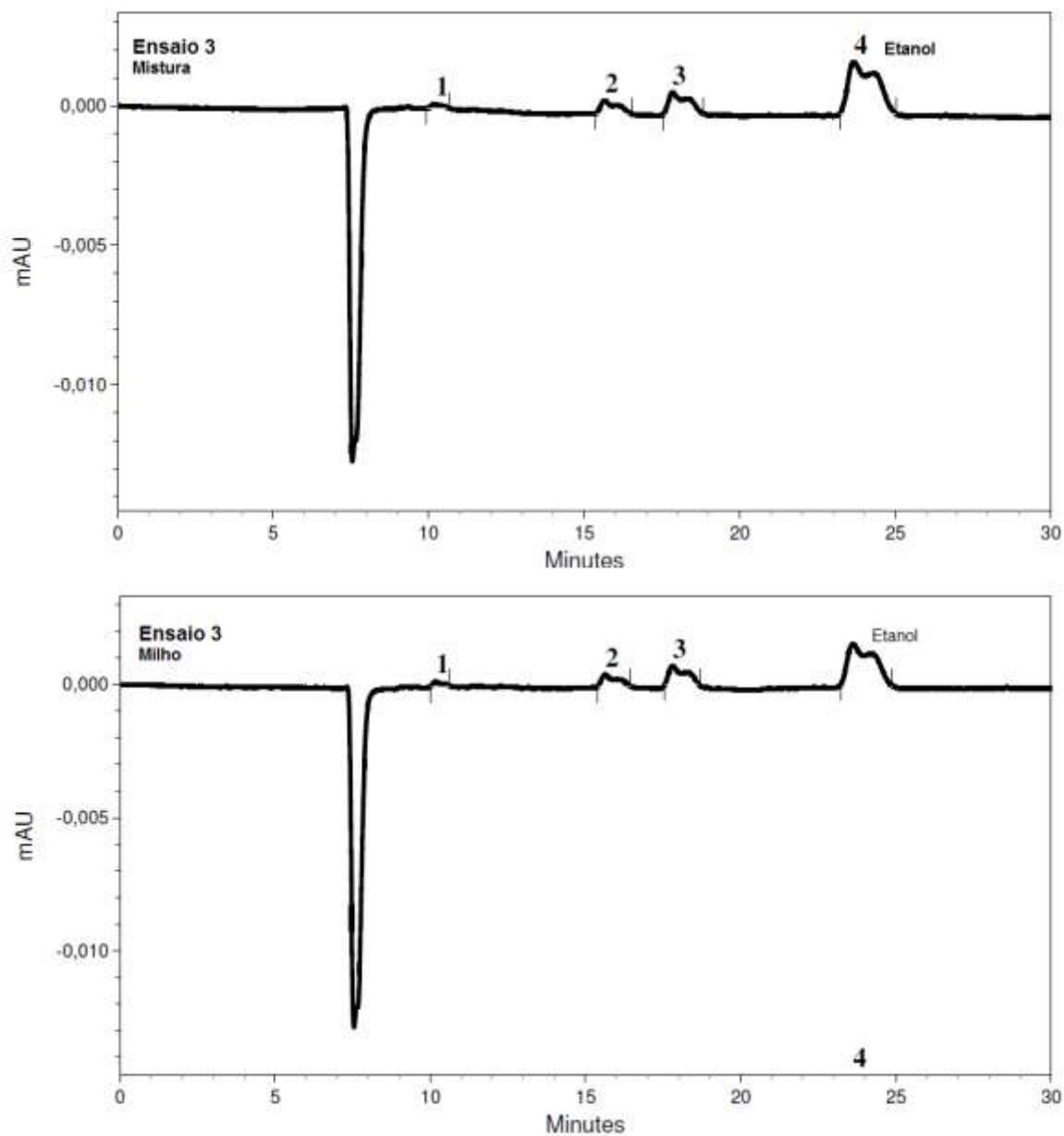


Figura C.1: Cromatogramas, obtidos por CLAE, na avaliação das fermentações em diferentes combinações das matérias-primas (Item 4.5.1). Mostrando o melhor rendimento de etanol em L/ha (mistura de batata-doce, mandioca e milho) e o melhor rendimento em L/Kg de matéria-prima (milho). Coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7,8 mm), fase móvel 8 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada); fluxo de 0,6 mL/min, a 40°C