

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)**

SHARLENE SILVA COSTA

**BIOUTILIZAÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (CRUEIRA) PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**São Cristóvão (SE)
(2016)**

SHARLENE SILVA COSTA

**BIOUTILIZAÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (CRUEIRA) PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Ferraz Silva

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

**São Cristóvão(SE)
(2016)**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C837b Costa, Sharlene Silva
Bioutilização de resíduo agroindustrial (crueira) para
produção de etanol de segunda geração / Sharlene Silva
Costa ; orientador Cristina Ferraz Silva - São Cristóvão,
2016.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Agroindústria - Resíduos. 2. Biocombustíveis. 3.
Mandioca como combustível. 4. Etanol. I. Silva, Cristina
Ferraz, orient. II. Título.

CDU 662.754:633.493

SHARLENE SILVA COSTA

**BIOUTILIZAÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (CRUEIRA) PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação de mestrado aprovado no Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Sergipe em 26 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.ª Cristina Ferraz Silva – Orientadora

Universidade Federal de Sergipe



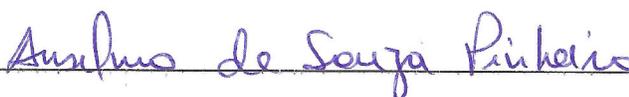
Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza – Coorientador

Universidade Federal de Sergipe



Prof. Dr. José Jailton Marques

Universidade Federal de Sergipe



Prof. Dr. Anselmo de Souza Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe

Dedico este trabalho de mestrado a toda minha família e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse finalizar essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimento à minha querida família, que sempre me apoiou e incentivou no meu desenvolvimento profissional, me educando para que com dedicação, humildade e trabalho eu pudesse chegar até a conclusão desse mestrado.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Cristina Ferraz Silva, por ter me recebido cordialmente na Universidade, assim que cheguei a Aracaju, e com muita dedicação, paciência e carinho acreditou no meu trabalho ao longo desses dois anos.

À grande cooperação do Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza pela coorientação e incentivo de todos os professores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química que contribuíram para a minha formação profissional.

Aos alunos de graduação em Engenharia Química Alana Mayara e Ian Mateus, pela colaboração e auxílio durante o desenvolvimento dos ensaios.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, por nos fornecer a estrutura necessária, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro, proporcionando recursos materiais para desenvolvimento do presente trabalho.

Agradeço a Deus por me iluminar em vários momentos de dúvidas e angústias que me preencheram.

RESUMO

O uso de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos está ganhando destaque para produção de biocombustíveis renováveis através do emprego de tecnologias modernas, econômicas e sustentáveis. Os resíduos agroindustriais ricos em amido vêm sendo estudados por apresentar um grande potencial para produção de bioetanol. Dentre os principais resíduos amiláceos está a crueira, a qual constitui um sólido produzido em abundância após a etapa de moagem e esfarelamento da mandioca processada para a obtenção de farinha. Para a bioconversão do amido contido na crueira é necessário um processo de sacarificação, o qual foi realizado no presente estudo utilizando um extrato enzimático produzido por *Bacillus* sp. Os açúcares fermentescíveis produzidos na hidrólise foram convertidos posteriormente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, gerando bioetanol como produto final do processo. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi estudar a bioutilização do resíduo agroindustrial (crueira) para produção de etanol de segunda geração. O resíduo foi caracterizado através de análises físico-químicas e o estudo do processo de hidrólise enzimática foi realizado através de Planejamento Experimental Fatorial Completo 2². Após, o hidrolisado foi utilizado para o processo de fermentação alcoólica. Os resultados das análises físico-químicas demonstraram que a crueira possui alto teor de amido ($82,00 \pm 0,58\%$). Através do Planejamento Experimental foi evidenciado que a variável concentração de crueira foi estatisticamente significativa, sendo a melhor faixa de sacarificação obtida de 100 a 108 g/L de crueira e 70 mL de extrato enzimático, atingindo 10 °Brix. Os ensaios cinéticos demonstraram que 20 h é o tempo necessário para concluir o processo de hidrólise. Os ensaios de fermentação alcoólica demonstraram um teor de etanol de 0,291 %, apresentando características físico-químicas diferentes do etanol produzido da cana-de-açúcar.

Palavras chaves: crueira; bioconversão; etanol; biotecnologia; mandioca.

ABSTRACT

The use of agro-industrial waste in biotechnological processes is gaining prominence for production of renewable biofuels through of modern, economic and sustainable technologies. The agro-industrial residues rich in starch have been studied for presenting a great potential for the production of bioethanol. Among the main starchy residue is the crueira, which is a solid produced in abundance after the grinding and flaking of the cassava processed to obtain flour. For the bioconversion of starch contained in the crueira is needed a saccharification process, which was conducted in this study using an enzyme extract produced by *Bacillus sp.* The fermentable sugars produced in the hydrolysis, were later converted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, producing ethanol as the final product. Therefore, the objective of this research was to study re-use of agro-industrial waste (crueira) for second-generation ethanol. The residue was characterized through physical-chemical analysis and the study of enzymatic hydrolysis process was made by Experimental Full Factorial Planning 2². Then, the hydrolyzate was used to the fermentation process. The results of the physico-chemical analysis showed that crueira has a high starch content ($82.00 \pm 0.58\%$). Through the Experimental Planning, it was evident that the variable concentration of crueira was statistically significant, with the best saccharification range obtained at 100 to 108 g / L crueira and 70 mL of enzymatic extract reaching 10 ° Brix. Kinetic studies demonstrated that 20 hours is the time required to complete the hydrolysis process. The alcoholic fermentation studies showed 0.291% ethanol content, having different physical and chemical characteristics of the produced ethanol from sugarcane.

Key words: crueira; bioconversion; ethanol; biotechnology; cassava.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Evolução nas vendas de veículos <i>flex fuel</i> no Brasil no período de 2003 a 2011.....	17
Figura 02: Evolução da produção de etanol no Brasil no período de 1948 a 2011.....	18
Figura03: Rotas tecnológicas para produção de etanol.....	22
Figura 04: Fluxograma de produção da farinha de mandioca.	24
Figura 05: Representação da amilose em arranjo espacial.....	26
Figura 06: Representação da amilopectina em arranjo espacial.....	27
Figura 07: Esquema simplificado de produção do extrato enzimático.....	36
Figura 08: Esquema simplificado do processo de fermentação alcoólica.....	40
Figura 09: Resultado da crueira seca.....	43
Figura 10: Ensaios do planejamento experimental.....	46
Figura 11: Gráfico de Pareto obtido a partir do Planejamento Fatorial Completo 2^2 para sacarificação da crueira.....	48
Figura 12: Superfície de resposta obtida no Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2	49
Figura 13: Resultado da cinética de sacarificação do amido da crueira com concentração de 100 g/L a 60 °C	50
Figura 14: Fermentação em triplicata dos hidrolisados.....	51
Figura 15: Fermentação no reator em batelada	52
Figura 16: Resultado dos sólidos solúveis da cinética da fermentação alcoólica no reator em batelada.....	53
Figura 17: Resultado do teor de etanol da cinética da fermentação alcoólica no reator em batelada.....	53
Figura 18: Resultado dos açúcares redutores da cinética da fermentação alcoólica no reator em btelada.....	54
Figura 19: Reação do DNS com açúcares redutores genéricos.....	55

LISTA DE TABELA

Tabela 01: Principais propriedades do etanol e da gasolina.....	19
Tabela 02: Composição de amilose e amilopectina em amidos de diferentes fontes.....	25
Tabela 03: Classificação das enzimas em função das reações catalisadas.....	28
Tabela 04: Características entre as enzimas α -amilases e glucoamilases.....	29
Tabela 05: Temperatura de gelatinização de amido de diferentes fontes	30
Tabela 06: Valores reais das variáveis utilizadas no Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 para sacarificação da crueira.....	38
Tabela 07: Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 para Sacarificação crueira.....	38
Tabela 08: Resultado dos parâmetros analisados para caracterização da crueira.....	44
Tabela 09: Resultado do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2	45
Tabela 10: Efeito estatístico das variáveis crueira e volume de extrato no Planejamento Fatorial Completo 2^2	47
Tabela 11: Análise de variância para a resposta °Brix no Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2	48
Tabela 12: Resultado dos parâmetros analisados para fermentação alcoólica.....	51
Tabela 13: Resultado dos parâmetros analisados a caracterização do etanol.....	55

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
2.0 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo específico	14
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Biocombustíveis.....	15
3.2 Bioetanol	16
3.2.1 A história do etanol no Brasil	16
3.2.2 O processo fermentativo	18
3.3 Etanol de segunda geração	21
3.3.1 Os resíduos agroindustriais para a produção de etanol	21
3.3.2 Os resíduos amiláceos	23
3.3.3 O amido.....	25
3.4 Enzimas como biocatalisador	27
3.4.1 Enzimas amilolíticas	28
3.5 Hidrólise enzimática do amido	30
4.0 METODOLOGIA.....	32
4.1 A caracterização da crueira	32
4.1.1 Pré-tratamento da crueira	32
4.1.2 Teor de umidade.....	32
4.1.3 Determinação do pH	32

4.1.4	Determinação do teor de cinzas	33
4.1.5	Determinação do teor de lipídeos.....	33
4.1.6	Determinação do teor de amido	34
4.1.7	Determinação do teor de fibra bruta e proteína.....	35
4.2	Produção de extrato bruto enzimático	35
4.2.1	Microrganismo	35
4.2.2	Preparo do meio de produção de enzima	35
4.2.3	Fermentação submersa	36
4.2.4	Cálculo da atividade enzimática.....	36
4.3	Processo de sacarificação da crueira	37
4.3.1	Determinação do °Brix	39
4.4	Determinação da cinética de sacarificação	39
4.5	Processo de fermentação alcoólica	39
4.5.1	Determinação da cinética de fermentação alcoólica	40
4.6	Análises	41
4.6.1	Determinação do °Brix	41
4.6.2	Determinação dos açúcares redutores	41
4.6.3	Determinação teor de etanol.....	41
4.6.4	Caracterização do etanol	42
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1	Resultados das análises físico-químicas	43
5.2	Resultados do processo de sacarificação enzimática.....	45
5.3	Resultados do processo de cinética de sacarificação.....	49
5.4	Resultados do processo de fermentação alcoólica.....	51

6.0 CONCLUSÃO.....	56
7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	57
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1.0 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm provocado muitas preocupações em todo o mundo e incentivado a necessidade de encontrar fontes renováveis de energia. Os impactos ambientais e a oscilação nos preços do petróleo são os principais fatores que estimulam a busca por biocombustíveis sustentáveis (FERREIRA; PASSADOR, 2014). Grande parte da energia consumida no mundo é oriunda de fontes não renováveis, como o petróleo e o carvão mineral, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias alternativas (ARAÚJO *et al*, 2013).

Governos de todo o mundo têm estimulado a expansão da produção e do consumo de energias limpas, tendo em vista que as emissões de gases de efeito estufa são frequentemente discutidas através de políticas públicas (DUNHAM *et al*, 2010; OLIVEIRA, 2015). Há uma grande tendência em empregar tecnologias modernas e eficientes para o desenvolvimento e produção de biocombustíveis produzidos a partir de biomassas, tornando-os mais competitivos em relação aos combustíveis fósseis (DEMIRBAS, 2008).

No Brasil, o etanol produzido por cana-de-açúcar mostrou-se benéfico, porém, a cultura da cana-de-açúcar exige solos com elevadas pluviosidades e fertilidade, além de possuir um limitado período útil de industrialização (FERREIRA *et al*, 2005). Para diminuir a dependência de uma monocultura para a produção de etanol e conseqüentemente atender as demandas de mercado, os resíduos agroindustriais surgem como uma nova possibilidade para a produção de combustíveis renováveis, sendo o seu bioprocessamento de grande interesse econômico e social (BRINGHENTI *et al*, 2007).

A utilização de resíduos agroindustriais como co-produtos para a produção de etanol apresenta inúmeras vantagens, como o baixo custo da matéria-prima, permitindo a bioconversão da mesma em produto comercial com um menor custo de processamento (ORTIZ, 2010; CRUZ *et al*, 2011). Dentre os resíduos agroindustriais de interesse econômico para a produção de etanol estão os resíduos amiláceos gerados no beneficiamento da mandioca para a produção de farinha, sendo eles a manipueira e a crueira, resíduos líquido e sólido, respectivamente (CAMILI, 2007; BRINGHENTI; CABELLO, 2005; SANTANA, 2007).

O resíduo sólido, crueira, é gerado em grandes quantidades durante o processo de produção da farinha de mandioca, sendo formada pela composição de pedaços de fibras e entrecasas da farinha de mandioca separadas por peneiramento antes da etapa de torração da massa prensada (ARAÚJO *et al*, 2014). Sua composição destaca-se pela quantidade de amido

retida e geralmente descartada, perdendo seu potencial energético para a conversão em produto comercial como etanol (NEVES, 2004).

Para a produção de etanol a partir do amido, é necessária uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de açúcares fermentescíveis, tendo em vista que o amido não pode ser convertido diretamente (TORRES *et al*, 2012). O processo de hidrólise ou sacarificação de materiais amiláceos pode ocorrer através de hidrólise enzimática, a qual apresenta bom rendimento, não origina produtos tóxicos indesejáveis ao meio e apresenta baixo custo de produção (TORRES *et al*, 2012; SANTANA, 2007).

O processo de hidrólise enzimática ocorre através do uso de enzimas amilolíticas, que representam um grupo enzimático de grande aplicação e fazem parte de uma tecnologia limpa que visa substituir gradativamente diversas reações químicas, apresentando vantagens por desenvolver reações em condições brandas de temperatura e pH (TORRES *et al*, 2012; FERREIRA; PASSADOR, 2014). O trabalho em questão tem como finalidade produzir etanol a partir do resíduo sólido (crueira), hidrolisado enzimaticamente, visando à geração de um biocombustível econômico e sustentável.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a produção de etanol amiláceo utilizando como matéria-prima o resíduo sólido obtido no beneficiamento da mandioca (crueira).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o resíduo sólido (crueira) através de análises físico-químicas;
- Produzir enzima amilase de *Bacillus* sp. ANRAS02, usando amido solúvel como substrato;
- Identificar as condições de otimização do processo de sacarificação do amido presente na crueira usando amilase bacteriana;
- Estudar o processo fermentativo do material hidrolisado utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial;
- Desenvolver a cinética de fermentação alcoólica;
- Obter o etanol, caracterizá-lo e compará-lo ao etanol de primeira geração produzido a partir da cana-de-açúcar.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocombustíveis

A matriz energética mundial tem participação total de 80% de fonte de carbono fóssil, sendo o petróleo, o carvão mineral e gás natural, os principais responsáveis pelo aquecimento global, devido às emissões de dióxido de carbono (CO₂) liberadas para a atmosfera (SANTOS 2012; OLIVEIRA *et al*, 2014). Os problemas ambientais ocasionados trouxeram uma preocupação com a preservação ambiental, levando assim os governos a buscarem estratégias para a produção e consumo de combustíveis obtidos a partir de processos renováveis e sustentáveis (SANTOS *et al*, 2012).

Nas últimas décadas, a produção de biocombustíveis evidenciou maior importância na redução da dependência em relação ao petróleo e conseqüentemente a minimização dos impactos ambientais (BARBOSA, 2014). A utilização dos biocombustíveis é, sem dúvida, uma alternativa energética para cumprir as metas estabelecidas para a redução de emissões de dióxido de carbono na atmosfera. Os principais acordos de mudanças climáticas, como o Protocolo de Kyoto e a 21ª Conferência do Clima (COP-21) tiveram como objetivo definir as diretrizes entre os países sobre a emissão de gases de efeito estufa, traçando como meta para o Brasil a redução de 43% até o ano de 2030 (OLIVEIRA, 2015; SALLET; ALVIM, 2011).

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de biocombustíveis, graças à combinação de condições favoráveis ao cultivo de cana-de-açúcar e à demanda interna crescente da frota de veículos *flex* (MILANEZ *et al*, 2008). Esse crescimento foi possível devido aos 35 anos de pesquisa e desenvolvimento na produção e no uso do etanol de primeira geração (DUNHAM *et al*, 2010). Diversos programas têm contribuído para a produção e o uso de biocombustíveis no Brasil, como o PROÁLCOOL, a Lei da Inovação (Lei 10,973/04), Lei do Biodiesel (Lei 11,097/05), o Plano Nacional de Agroenergia (PNA 2006-2011) e o Plano de Aceleração de Crescimento (PAC- 2007-2010) (DURÃES, 2008).

Biocombustíveis compreendem uma denominação genérica dada aos combustíveis derivados de biomassas como a cana-de-açúcar e outras fontes de matérias orgânicas. A partir das biomassas é possível gerar bioenergia através da produção de etanol, biodiesel, carvão vegetal e biogás (GOMES; CHAVES, 2014; ESPÍNDOLA, 2009). Em especial, o etanol e o biodiesel têm constituído um vetor de desenvolvimento na economia brasileira, gerando empregos e acrescentando bilhões de reais ao PIB brasileiro (FERREIRA; PASADOR, 2014). O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira como uma estratégia do Governo Federal de promover um biocombustível renovável que pudesse ser adicionado ao diesel

mineral, contribuindo para o desenvolvimento regional, gerando emprego e renda no campo (COSTA;MENDES, 2010). Atualmente, há uma variedade de combustíveis renováveis produzidos no Brasil, conforme o Decreto nº 62/2006 apresentados no Quadro 01.

Quadro 01: Diferentes tipos de biocombustíveis e obtenção

Bioetanol	Etanol produzido a partir da biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos para a utilização como biocombustíveis
Biodiesel	Éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustíveis para motor diesel, para utilização como biocombustível
Biogás	Gás produzido a partir de biomassa e/ou de fração biodegradável de resíduos, que pode ser purificado até a qualidade de gás natural, para a utilização como biocombustível, ou gás de madeira
Biometanol	Metanol produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível,
Bioéter dimetílico	Éter dimetílico produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível
Bio-ETBE (bioéteretil-ter-butílico)	ETBE produzido a partir do bioetanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-ETBE considerada como biocombustível de 47%
Bio-MTBE (bioétermetil-ter-butílico)	Combustível produzido com base no biometanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-MTBE considerada como biocombustível de 36%,
Biocombustível sintético	Hidrocarbonetos sintéticos ou misturas de hidrocarbonetos sintéticos produzidos a partir de biomassa
Biohidrogênio	Hidrogênio produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos para a utilização como biocombustível
Óleo vegetal puro produzido a partir de plantas oleaginosas	Óleo produzido por pressão, extração ou métodos comparáveis, a partir de plantas oleaginosas, em bruto ou refinado, mas quimicamente inalterado, quando a sua utilização for compatível com os tipos de motores e os respectivos requisitos relativos à emissão.

Fonte: BRASIL, 2006

3.2 Bioetanol

3.2.1 A história do etanol no Brasil

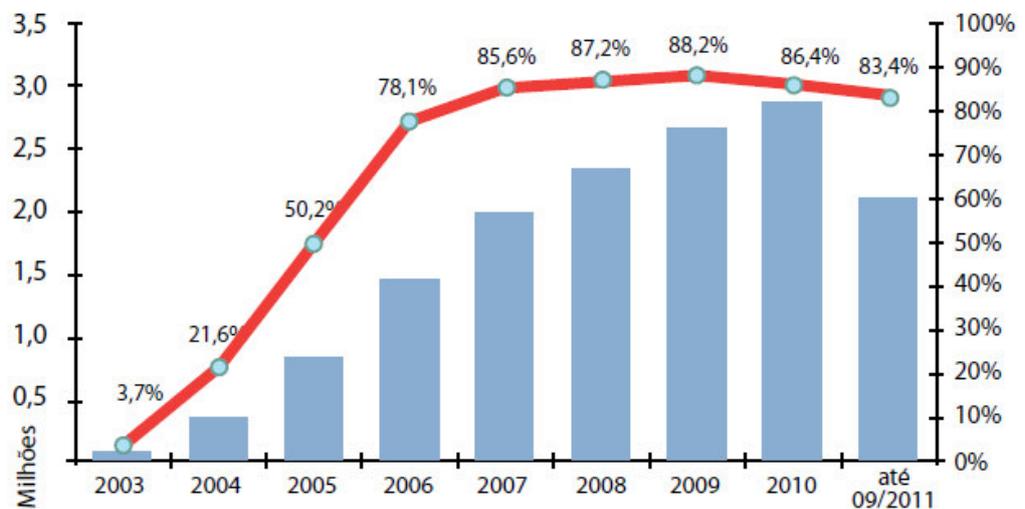
A história do etanol no Brasil inicia-se em 1970 com a criação do Programa Nacional de Álcool (PROÁLCOOL), que foi criado pelo governo brasileiro, impondo requisitos importantes com a ampla distribuição do produto nos postos de combustíveis (GORDINHO, 2010). O PROÁLCOOL foi um programa pioneiro que tinha como objetivo produzir combustível alternativo que substituísse a gasolina como carburante (ANDRIETTA *et al*, 2006).

Durante o período da ditadura militar, foi impulsionada a criação de novas destilarias de álcool, incentivando a utilização de créditos estatais mais baratos com o objetivo de

beneficiar os produtores e aumentar a produção de álcool no Brasil por intermédio do Petróleo Brasileiro S/A – Petrobras (KOHLHEPP, 2010). Com essa iniciativa do governo, a produção de etanol começa a ganhar impulso e sua produção passou de 555,6 mil m³ na safra 1975/1976 para 2.490,6 mil m³ na safra 1978/1979, um aumento superior a 300% no período (MICHELLON *et al*, 2008).

Segundo Cinelli (2012), no período de 1973 a 1985, houve um aumento da produção de 660 milhões de litros por ano para 11,9 bilhões de litros para abastecer a nova frota de automóveis projetada para o consumo do álcool produzido. Até meados de 1987, a produção de etanol chegou a atingir o marco de 12 bilhões de litros, sendo que, em 1989, havia no Brasil 4,5 milhões de carros movidos a etanol (VIEIRA *et al*, 2007).

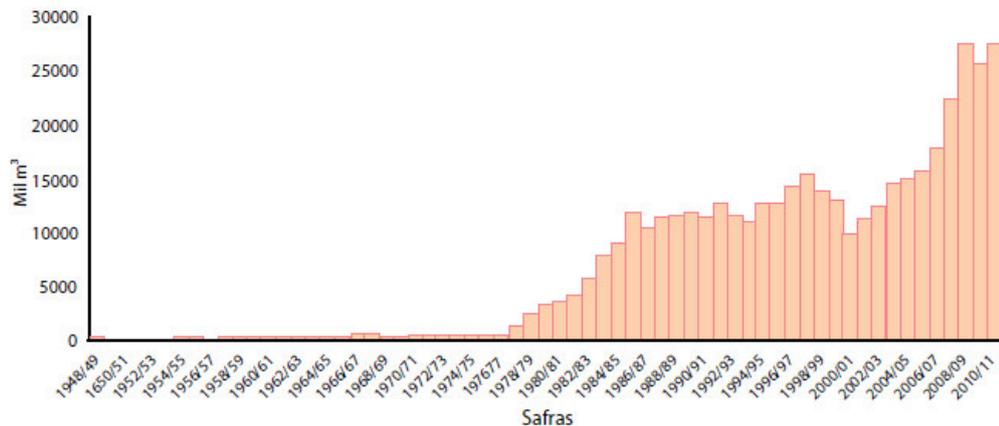
Na década de 90 houve uma desaceleração do PROÁLCOOL devido à queda do preço do petróleo, e, em meados de 2003, o programa renasce pelos esforços dos produtores de etanol e da indústria automobilística brasileira (GORDINHO, 2010). A Figura 01 apresenta a evolução do crescimento da produção e venda dos veículos *flex* a partir de 2003, retomando o consumo de etanol hidratado no mercado interno brasileiro (BNDES, 2008).



Fonte: BRASIL, 2012

Figura 01: Evolução nas vendas de veículos *flex fuel* no Brasil no período de 2003 a 2011

De acordo com Gordinho (2010), os veículos *flex fuel* foram rapidamente aprovados pelos consumidores brasileiros e conquistaram o mercado em progressão geométrica. O número de automóveis *flex* atingiu um marco histórico em fevereiro de 2008, quando suas vendas ultrapassaram os 50% dos carros novos e, em sete anos, foram vendidos 10 milhões de carros. Com isso, a produção de etanol por safra também apresenta uma ascendência relevante, como pode ser visualizado na Figura 02.



Fonte: BRASIL, 2012

Figura 02: Evolução da produção de etanol no Brasil no período de 1948 a 2011

Em 2009, o Brasil proporcionou a criação de uma infraestrutura nacional de produção e distribuição, que o tornou o maior exportador mundial de etanol, atingindo a marca de 3,3 bilhões de litros (CINELLI, 2012). A produção de etanol brasileiro em 2010 atingiu uma produção nacional de 27,9 bilhões de etanol e há indicações que para o ano de 2020/2021 serão produzidos 65,3 bilhões de litros (SANTOS, 2012). Segundo dados da Conab (2015), a produção nacional na safra de 2014/2015 consolidou 28,66 bilhões de litros de etanol e está estimada em 26,52 bilhões de litros para a safra de 2015/2016. O etanol anidro utilizado na mistura da gasolina também deverá apresentar um aumento de 238,8 milhões de litros (CONAB, 2015).

3.2.2 O Processo Fermentativo

O etanol é considerado um combustível renovável e limpo, não deriva do petróleo e apresenta composição constituída por dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e um grupo hidroxila, podendo emitir até 80% menos de gases do efeito estufa (OLIVEIRA *et al* 20014; ORTIZ, 2010). O etanol ou álcool etílico é uma substância de fórmula molecular C_2H_6O , compreende um líquido inflamável, incolor e com odor característico, podendo ser encontrado de duas formas, etanol hidratado e etanol anidro (PESSANHA; FILHO, 2012).

A principal diferença entre os dois tipos de etanol consiste no teor de água, sendo que o etanol hidratado apresenta um percentual de 5% de água em sua composição, e o etanol anidro apenas 0,5% (OLIVEIRA *et al*, 2014). As especificações devem ser atendidas e respeitadas por toda a cadeia de comercialização, de acordo com a Portaria ANP 309/2001,

para a gasolina com etanol anidro, e pela Portaria ANP 36/2005, para o etanol anidro e hidratado (BNDES, 2008).

Quando comparados ao petróleo e seus derivadas, o etanol anidro e hidratado apresentam baixa toxidez e elevada biodegradabilidade, fatores relevantes em caso de acidentes com vazamento de combustíveis nos solos e no litoral (UNICA, 2007). Com relação às suas principais propriedades, esses combustíveis apresentam parâmetros distintos, conforme é apresentado na Tabela 01.

Tabela 01: Principais propriedades do etanol e da gasolina

Parâmetros	Unidade	Gasolina	Etanol
Poder calorífico	kJ/kg	43500	28225
	kJ/litro	32180	22350
Densidade	kg/litro	0,72 - 0,78	0,792
Octanagem RON	-	90 - 100	102-103
Octanagem MON	-	80 - 92	89-96
Calor latente de vaporização	kJ/kg	330 - 400	842-930
Relação AR/Combustível	-	14,5	9,0
Pressão de vapor	kPA	40 - 65	15-17
Temperatura de ignição	°C	220	420
Solubilidade em água	% em volume	0	100

Fonte: BNDES, 2008

Para a produção de etanol, a via fermentativa é a mais importante para o Brasil, podendo ser de primeira geração ou de segunda geração (SILVA, 2010). O etanol de primeira geração é caracterizado pela presença de açúcares fermentescíveis, como no caso do caldo de cana-de-açúcar, mas quando a etapa de sacarificação é necessária, caso em que os açúcares fermentescíveis encontram-se na forma de amido ou celulose, denomina-se etanol de segunda geração (ORTIZ, 2010). Em ambos os casos, o processo de fermentação alcoólica ocorre no interior da célula do microrganismo, a qual é responsável pela degradação de moléculas de açúcares (glicose ou frutose) até a formação de etanol e dióxido de carbono (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato pode ser matéria-prima para a produção de etanol (BORZANI *et al*, 2001). De acordo com Cinelli (2012), as matérias-primas podem ser classificadas em sacarínea, compreendendo os açúcares que podem ser diretamente consumidos como o da cana-de-açúcar, beterraba, melão e frutas; amiláceas, que são ricos em amidos e precisam ser hidrolisados para gerar açúcares fermentescíveis; e lignocelulósicas, que são os açúcares encontrados na forma de celulose,

como no bagaço de cana e na madeira, os quais também precisam ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis.

O microrganismo mais utilizado na indústria produtora de fermentados é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta características que a consagram como os microrganismos mais indicado, incluindo a rapidez na transformação de açúcar em etanol, alta tolerância ao produto formado, tolerância a grandes variações de temperaturas e atividade celular em meio ácido (ANDRIETTA *et al*, 2006). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo facultativo, ou seja, seu metabolismo é ajustado de acordo com as condições de aerobiose e anaerobiose (BORZANI *et al*, 2001).

As leveduras são microrganismos mesófilos, pois desenvolvem suas atividades na temperatura ótima entre 26-35°C, e multiplica-se por via sexual e assexual, sendo a via assexual a mais utilizada para a multiplicação nos processos industriais (ORTIZ, 2010; VENTURINI FILHO; MENDES, 2003). Nas destilarias, o sistema de recuperação de microrganismos mais utilizado é chamado de *Melle-Boinot*, cuja principal característica é a recuperação da levedura por centrifugação durante todo o processo (BNDES, 2008).

Na fermentação alcoólica, a glicólise é a via bioquímica central de produção de etanol, onde o catabolismo da glicose tem como produto final o piruvato (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003). De acordo com Silva (2010), o processo de oxidação da glicose em dois ácidos pirúvicos ocorre em duas etapas, sendo a primeira quando duas moléculas de ATP são utilizadas para a fosforilação de uma molécula de glicose, a qual é reestruturada e quebrada em gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxacetona fosfato (DHAP), sendo esta convertida em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas a ácido pirúvico através de várias etapas enzimáticas.

Esse processo de transformação da glicose em etanol e CO₂ envolvem 12 reações sequenciais e ordenadas, catalisadas por enzimas específicas encontradas no citoplasma celular do microrganismo, sendo esse processo finalizado quando o piruvato é descarboxilado formando acetaldeído e posteriormente reduzido a etanol. (BORZANI *et al*, 2001). O processo fermentativo pode ser representado pela equação estequiométrica formulada por Gay-Lussac. O coeficiente de Gay-Lussac ou rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g de etanol/g de glicose consumida, porém durante o processo industrial de produção de etanol esse valor não é observado, devido a formação de álcoois superiores e glicerol durante a síntese celular e manutenção da levedura (BARCELOS, 2012). A formação de glicerol no processo fermentativo está relacionada há uma grande concentração de sais no meio e a proteção de estresse osmótico celular (CHIEPPE JUNIOR, 2012).

3.3 Etanol de segunda geração

3.3.1 Resíduos Agroindustriais para a produção de etanol

O desenvolvimento do bioetanol através de materiais lignocelulósicos teve início no fim do século XIX, sendo essa tecnologia difundida por diversos países somente no Século XX (BNDES, 2008). No Brasil, o etanol produzido origina-se quase na totalidade da fermentação de açúcares extraídos da cana-de-açúcar, graças à grandiosidade do território brasileiro que permite ao Brasil ser o maior produtor dessa cultura (ANDRIETTA *et al*, 2006).

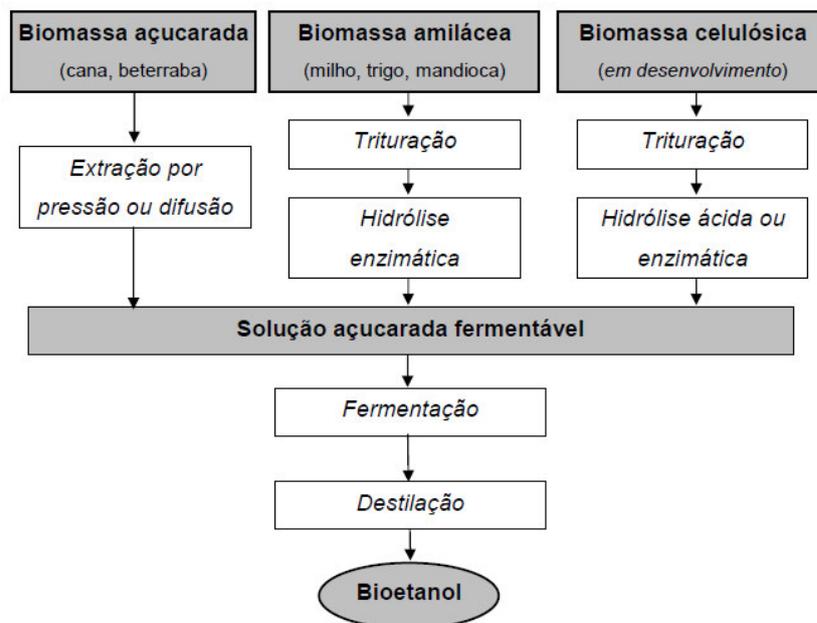
A produção de etanol de primeira geração a partir da sacarose é um processo bem estabelecido atualmente, com os menores custos e maior produtividade do mundo (PACHECO, 2010). O caldo de cana apresenta rendimentos de aproximadamente 80 litros de etanol por tonelada, tornando-o um substrato com custo de produção por litro de etanol inferior ao custo do processamento de milho para o mesmo fim (ANDRIETTA *et al*, 2006). Nem todos os países apresentam as mesmas condições para o plantio da cana como Brasil, sendo necessário encontrar outros tipos de matérias-primas para a produção do etanol, como é o caso dos Estados Unidos que utilizam a fermentação do milho (MILANEZ *et al*, 2008; ANDRIETTA *et al*, 2006).

A necessidade de buscar processos alternativos está relacionada com a diminuição da dependência da produção nacional de etanol com apenas um tipo de cultivo, como, por exemplo, a cana-de-açúcar (CINELLI, 2012). Muitas críticas são feitas em relação à produção de etanol de primeira geração devido a atual pressão gerada sobre o preço dos alimentos (DUHAM *et al*, 2010). Para Kohlhepp (2010), o futuro dos biocombustíveis está na produção de etanol de segunda geração, em que o etanol será produzido de bagaço de cana, celulose e outras matérias orgânicas, aumentando sua produtividade de 40% a 50% e diminuindo a pressão pelo uso de terras. Estima-se que, nas próximas décadas, ocorrerá um aumento na demanda por alimentos, e com isso para a produção de alimentos será necessária a utilização de extensas áreas agricultáveis, favorecendo a produção de etanol de segunda geração (DUHAM *et al*, 2010).

Os resíduos agroindustriais compreendem as matérias geradas num processo industrial que podem ser utilizadas para gerar novos produtos através de processos biotecnológicos. O Brasil apresenta vantagens competitivas em relação a outros países também na produção de etanol de segunda geração, devido à facilidade de obtenção de

resíduos agroindustriais como a palha e bagaço de cana (PACHECO, 2010). O etanol obtido por diferentes matérias-primas apresentam rotas tecnológicas características, conforme mostrado na Figura 03.

Em algumas regiões, a produção de etanol de segunda geração apresenta vantagens no cultivo de outras culturas agrícolas, como produção de arroz, trigo e milho. Segundo Santos (2012), menos de 1% de palha de milho é recolhida para o processo industrial nos países da Europa Ocidental. Já nos Estados Unidos, 90% da palha de milho são deixadas no campo, enquanto na Ásia são gerados 667,6 milhões de toneladas e 145,2 milhões de toneladas de palha de arroz e trigo, respectivamente. O aproveitamento desses resíduos proporciona o uso de insumos de baixo custo e evita o indesejado acúmulo de biomassa no meio ambiente, o que torna os processos mais econômicos, agregando valor a cadeia produtiva (CINELLI, 2012).



Fonte: BNDES, 2008

Figura 03: Rotas tecnológicas para produção de etanol

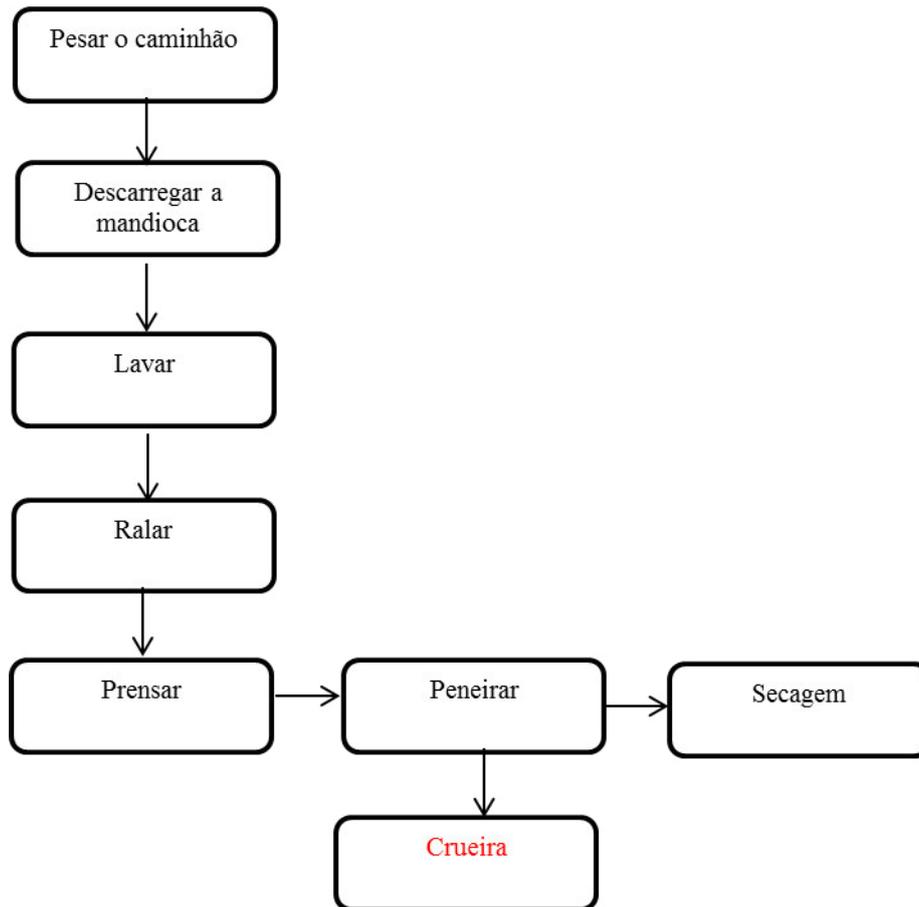
3.3.2 Os resíduos amiláceos

A mandioca doce é também conhecida em algumas regiões do país por aipim ou macaxeira (*Manihot Esculenta Crantz*). É uma planta de origem da América do Sul, com mais de 2.100 espécies e cores variadas (FILHO; ALVES, 2004). Sua cultura exerce um papel importante na agricultura nacional, gerando empregos e rendas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (ARAUJO; LOPES, 2009). A planta *Manihot Esculenta Crantz* caracteriza-se por uma parte aérea composta por folhas e hastes e uma parte subterrânea que é a raiz. A composição média da raiz é de 71,5 % de umidade, 94,10 % de carboidrato, 2,40 de cinzas e 0,43 % de proteína bruta (CAMILLI, 2007). Com grandes reservas de amido de alto valor energético, sua composição varia em relação às condições de cultivos e os estágios de desenvolvimentos (CRISTÉ; COHEN, 2006).

O Brasil ganha destaque no cultivo e no processamento industrial da mandioca. Segundo dados do IBGE (2016), estima-se que a produção de mandioca na safra 2016 poderá atingir 23,7 milhões de toneladas, caracterizando um aumento de 4,2 % em relação ao ano de 2015, sendo destaque a região Nordeste com um aumento de 9%, destacando o estado de Sergipe como a 4º maior produtora de mandioca na safra 2015.

No processamento industrial há geração de uma quantidade significativa de resíduos que atualmente são descartados ou subutilizados (COSTA, 2004). O processo inicia-se com a colheita da raiz e o transporte, sendo posteriormente higienizadas para a retirada das impurezas (ARAUJO; LOPES, 2009).

É necessário descascar, lavar e ralar as raízes de mandioca, sendo que a massa ralada é posteriormente prensada (COSTA, 2004). A massa produzida é prensada para reduzir sua umidade, ficando então compactada devido a forte compressão a qual é submetida. O peneiramento é a etapa a qual gera um material composto por pedaços de raízes e entrecasas denominados crueira, conforme apresentado na Figura 04 (CURCELLI *et al*, 2008).



Fonte: COSTA, 2004

Figura 04: Fluxograma de produção da farinha de mandioca

A crueira caracteriza uma fração grosseira, constituída de pedaços de raízes, cascas e entrecasas que não foram trituradas totalmente (ARAÚJO; LOPES, 2009). É um subproduto sólido constituído por um material fibroso e normalmente é descartado de forma inadequada poluindo o meio ambiente (NEVES, 2004). Sua composição apresenta em média 11,7 % de umidade e em base seca apresenta 0,52 % de proteína, 68 % de amido, 1,74% de matéria graxa, 0,6 % de cinzas, 5,39 de pH e 3,800 KJ . A composição apresenta variações em relação às condições climáticas e do solo, idade da planta, entre outros fatores (CARVALHO, 2005).

Através de estudo desenvolvido por Araújo *et al* (2014), uma tonelada de mandioca produz 15,4 kg de crueira, e essa quantidade pode variar com o tempo de coleta, tipo de cultivo e ajuste do ralador. Algumas estimativas demonstram que aproximadamente 10% da mandioca utilizada na fabricação de farinha são eliminados na forma de crueira, o qual pode retornar ao processo e passar por uma retrituração ou serem utilizados na produção de ração animal (PEREIRA JUNIOR *et al* 2013; ARAÚJO *et al*, 2014). Esse resíduo demonstra um

potencial energético para alimentação animal devido às características analisadas como 93,7% de carboidrato e 1,7% de proteína bruta (PEREIRA JUNIOR *et al*, 2013).

Outro resíduo gerado a partir do processamento da mandioca para a produção de farinha é a manipueira. Em Tupi Guarani significa o que brota da mandioca, e caracteriza-se pela água de constituição das raízes que são extraídas na prensagem da massa ralada (CARVALHO, 2005). A manipueira apresenta aspecto leitoso, cor amarela-clara e volume de 279,1 L/t de mandioca (ARAUJO *et al*, 2014). Segundo Bringheti e Cabello (2005), a produção de etanol a partir dos resíduos do processamento industrial da mandioca é uma alternativa para transformar os resíduos amiláceos em coprodutos, gerando tanto receita para as indústrias como benefícios mercadológicos de uma indústria limpa.

3.3.3 O amido

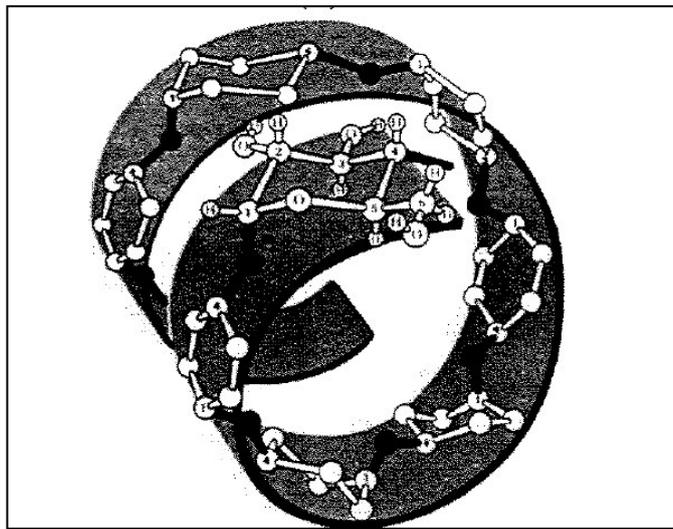
A crueira constitui uma matéria-prima amilácea, ou seja, possui como principal componente o amido, o qual compreende o produto final do processo fotossintético e constitui a reserva de carbono das plantas. O amido é um homopolissacarídeo ramificado constituído por unidades de D-glicose e fórmula química representada por $(C_6H_{10}O_5)_n$, sintetizado na forma de grânulo de geometria aproximadamente esférica (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003; CINELLI, 2012). O amido é composto principalmente por duas frações de alta massa molecular que são a amilose, correspondente a 15-30 % da massa total do amido, e a amilopectina, correspondente a 75-80 % da massa total (ORTIZ, 2010; CINELLI, 2012; COLLARES, 2011). A variação da composição de amilose e de amilopectina está relacionada à origem do amido, conforme descrito na Tabela 02.

Tabela 02: Composição de amilose e amilopectina em amidos de diferentes fontes.

Produto	% Amilose	% Amilopectina
Amido de Milho	24 - 27	70
Amido de Arroz	15 – 18,5	79
Amido de trigo	20 - 25	80
Amido de Mandioca	16,7 - 20	80
Amido de Batata	22 - 25	75

Fonte: SCIPIONE, 2011

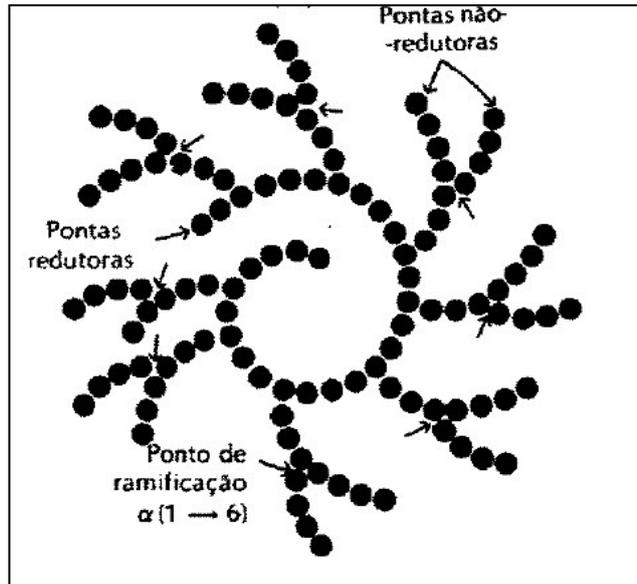
A amilose é uma molécula linear formada por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1-4)$ com um pequeno número de ligações (HANSEN *et al*, 2008). O comprimento da cadeia linear varia de acordo com a fonte, ou seja, com a planta de onde é extraída, podendo variar de 250 a 300 unidades de D-glicose formadas uniformemente por pontes glicosídicas que conferem uma forma helicoidal à molécula, conforme apresentado na Figura 05 (TAPARELLI, 2005). A massa molar é variável e dependente da fonte de amido. A presença da amilose pode ser identificada através da reação com iodo, onde é formado um complexo de coloração azul característica (BARCELOS, 2012).



Fonte: TOPARELLI, 2005

Figura 05: Representação da amilose em arranjo espacial

A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada e composta por 1000 unidades de D-glicose ou mais, unidas por ligações $\alpha-1,4$ e interconectadas por ligações $\alpha-1,6$, constituída por 4% de ligações totais (SANTANA, 2012; TAPARELLI, 2005). O comprimento das ligações é variável e apresentam em torno de 20 a 30 unidades de glicose, e na presença de iodo apresenta coloração avermelhada (Barcelos, 2012). Na Figura 06, a estrutura da amilopectina é representada na forma helicoidal.



Fonte: TOPARELLI, 2005

Figura 06: Representação da amilopectina em arranjo espacial

3.4 Enzimas como Biocatalisadores

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os seres vivos. Possuem estruturas complexas constituídas principalmente por uma parte proteica que pode ser integrada a outras moléculas, como por exemplo, carboidratos e lipídeos (ORLANDELLI *et al*, 2012). Segundo Spier (2005), enzimas são biocatalisadores de estrutura proteica globular terciária ou quaternária e termolábeis. São heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas (GIOVANI, 2014).

O princípio de ação das enzimas está baseado na catálise enzimática que é a capacidade de uma enzima diminuir a energia do estado de transição com a diminuição da energia de ativação, favorecendo cineticamente a reação (CINNELI, 2012). Composta por uma estrutura primária, que corresponde à sequência de seus aminoácidos, e uma estrutura secundária formada por arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β (GIOVANINI, 2014). Sua estrutura terciária descreve a conformação tridimensional que a molécula proteica assume em solução, enquanto a estrutura quaternária é a organização apresentada por duas ou mais cadeias polipeptídicas (BORZANI *et al*, 2001).

Há uma ampla aplicação das enzimas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, nas áreas ambientais e na produção de biocombustíveis, por apresentarem propriedade de alta especificidade e seletividade química, bem como por serem biocatalisadores que participam

de diversas reações químicas, conforme a classificação apresentada pela Tabela 03 (CINELLI, 2012).

As enzimas podem ser obtidas de três grandes fontes, sendo vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do fígado), animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsinas, catalase, renina) e microrganismos (amilases, proteases, pectinases, invertases glicose-oxidases, celulasas, fitases, glicose-isomerases) (HARGER *et al*, 1982).

Tabela 03: Classificação das enzimas em função das reações catalisadas

Categoria	Tipo de reação catalisada
Oxiredutases	Transfere elétrons
Transferases	Reação de transferência de grupo
Hidrolases	Reação de hidrólise
Liases	Adição de grupo a ligações duplas
Isomerases	Transferência de grupos no interior de uma molécula com formação de isômeros
Ligases	Formações de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e clivagem do ATP.

Fonte: SUMERLY *et al*, 2003

3.4.1 Enzimas amilolíticas

As enzimas amilolíticas são proteínas que catalisam as reações de hidrólise, ou seja, são responsáveis pela degradação do amido e apresentam um grupo enzimático com grande aplicação industrial (SURMELY *et al*, 2003; MISCHAN *et al*, 2012). Catalisam reações de hidrólise de ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ encontradas nos polissacarídeos, recebendo a denominação de amilases (NEVES, 2004). As amilases compreendem uma classe de hidrolases que agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido e podem ser divididas em três grupos, sendo as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases), as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato (SPIER, 2005; GONÇALVES *et al*, 2011).

As α -amilases catalisam especificamente a hidrólise das ligações $\alpha(1-4)$ do amido, e não catalisam as ligações $\alpha(1-6)$, transformando o amido em α -dextrinas de alto peso molecular e são consideradas liquidificantes, tendo em vista que promovem a redução da viscosidade de pastas gelificadas de amido (SURMELY *et al*, 2003). O fato dessas enzimas

não romperem as ligações α (1-6), estas permanecem intactas após o tratamento com α -amilases (COLLARES, 2012).

As β -amilases compreendem exoenzimas que agem de forma ordenada e atacam a amilose e a amilopectina somente a partir das extremidades não redutoras e hidrolisa as ligações α (1-4), gerando β -maltose e uma nova molécula de amido com peso molecular reduzido (SANTANA, 2007). As β -amilases são consideradas enzimas sacarificantes porque produzem açúcares a partir do amido, e o surgimento de glicose pode ocorrer em casos que o número de glicoses é ímpar a partir da quebra da maltose (SURMELY *et al*, 2003).

As enzimas glucoamilases ou também conhecidas como amiloglucosidases possuem características liquidificantes e sacarificantes, que hidrolisam completamente o amido em glicose a partir de uma extremidade não redutora. É a única enzima capaz de hidrolisar as ligações α (1-4) e α (1-6), resultando na transformação total do amido em glicose (SURMELY *et al*; 2003). As amiloglucosidases são usadas em amidos liquefeitos com α -amilases para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas (SPIER, 2005).

A produção de enzimas amilolíticas pode ser desenvolvida através de algumas espécies de fungos, sendo mais comuns as espécies *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, e também através de bactérias como as espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (COLLARES, 2012). A Tabela 04 apresenta as diferentes características entre as enzimas α -amilases e as glucoamilases.

Tabela 04: Características entre as enzimas α -amilases e glucoamilases

Características	α -amilases	Glucoamilases
Especificidade	ligações α (1-4)	ligações α (1-4) e α (1-6)
Mecanismo	Endoamilase	Exoamilase
Principal produto da hidrólise	Dextrinas	Glicose
Perda da cor do iodo	Lento	Lenta
Aumento do poder redutor	Lenta	Rápida
Produção de glicose	Lenta	Rápida
Produção de maltose	Lenta	Não
Produção de dextrina	Rápida	Lenta

Fonte: TAPARELLI, 2005 *apud* COLLARES, 2012

3.5 Hidrólise enzimática do amido

O processo de hidrólise do amido promove uma modificação em sua estrutura que pode ser realizada de forma química e biológica, sendo que a última forma apresenta inúmeras vantagens como o menor consumo de energia, simplificação da linha de produção com reatores unitários de liquefação, e sacarificação (BARCELOS, 2012). O processo de hidrólise consiste na clivagem do polímero de amido para a formação de fragmentos de cadeia curta, como a dextrina, a maltose ou a glicose (SCIPIONI, 2011).

Os grânulos permanecem intactos na maioria dos processos envolvendo o amido e possuem uma capacidade limitada de absorção de água fria, sendo controlada pela estrutura cristalina do grânulo, que por sua vez, depende do grau de associação e arranjo molecular do componente do amido (SCIPIONI, 2011; TAPARELLI, 2005). Para a melhor atuação das enzimas, é necessário o aquecimento do amido denominado de gelatinização, que torna a molécula mais acessível, pois causa uma transição irreversível dos grânulos e a concomitante solubilização da amilose e amilopectina, induzindo a gradual perda da integridade granular (BARCELOS, 2012).

Esse processo consiste no rompimento das pontes de hidrogênio que mantêm o arranjo molecular dentro do grânulo e na hidratação dos grupos hidroxilas das unidades de glicose que participam das áreas cristalinas, promovendo o inchaço dos grãos e a lixiviação da amilose (TAPARELLI, 2005). A ação das gorduras que atuam no revestimento dos grãos pode dificultar a absorção de água e conseqüentemente o retardamento desse processo (SURMELY *et al*, 2003). A temperatura de gelatinização é diferente para diversas fontes botânicas conforme detalhado na Tabela 05.

Tabela 05: Temperatura de gelatinização de amido de diferentes fontes

Vegetal	Temperatura (°C)		
	Início	Meio	Fim
Milho	62,0	66,0	70,0
Trigo	59,5	62,5	64,0
Batata	58,0	62,0	66,0
Mandioca	52,0	59,0	64,0

Fonte: SCIPIONE, 2011

Após o processo de gelatinização, as enzimas aumentam a velocidade de hidrólise em sistemas de ataques múltiplos formando um complexo entre a enzima e o substrato, originando as primeiras clivagens, reduzindo as cadeias de amido em cadeias menores (NEVES, 2004). Esse processo de clivagem do amido em cadeias menores consiste no processo de hidrólise que é realizado em duas etapas, sendo elas a liquefação e a sacarificação. Na hidrólise enzimática, a liquefação envolve a adição de enzimas α -amilases, ditas dextrinizantes, que atuam sobre os grãos de amido, rompendo-os na faixa de temperatura aproximada da gelatinização (SCIPIONI, 2011).

A função da sacarificação é quebrar as cadeias menores provenientes da liquefação utilizando enzimas amiloglicosidase, dando origem ao hidrolisado de grande importância para o processo de produção de etanol (SURMELY *et al*, 2003; COLLARES, 2012). Ao final do processo de hidrólise enzimática haverá formação de uma solução composta por moléculas de D-glicose que é definida como dextrose equivalente (DE) igual a 100 (CAMILLI, 2007).

4.0 METODOLOGIA

4.1 A caracterização da crueira

A crueira, resíduo sólido da produção da farinha de mandioca, foi disponibilizada por casas de farinha parceiras localizadas na região de São Cristóvão, Sergipe. As análises físico-químicas da crueira como teor de umidade, cinza, lipídeos, amido, fibra bruta e proteína e, determinação de pH, foram desenvolvidas através de métodos experimentais realizados no Laboratório de Bioquímica Industrial, localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQ) do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e para a obtenção dos resultados finais foram realizadas as médias e desvios padrão para cada parâmetro analisado.

4.1.1 Pré-tratamento da crueira

A crueira foi inicialmente seca em estufa, à temperatura 60°C, por 18 h, e, em seguida, resfriada em dessecador até temperatura ambiente. Após esse período, o resíduo foi homogeneizado utilizando um liquidificador doméstico até atingir o aspecto de farinha e, dessa forma, foi possível realizar os procedimentos de caracterização.

4.1.2 Teor de umidade

O teor de umidade da crueira foi determinado pelo sistema de secagem direta em estufa a 105°C, segundo a metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Foram pesados 3 g de crueira e posteriormente aquecidos durante 3 h e resfriada em dessecador à temperatura ambiente, até a obtenção de massa constante. O teor de umidade foi calculado pela percentagem de água evaporada pela amostra durante a secagem, conforme descrito na Equação 01.

$$\frac{100 m}{P} = \% \textit{umidade} \quad (01)$$

Sendo:

m = peso em gramas de água evaporada após secagem;

P = peso em gramas da amostra.

4.1.3 Determinação do pH

Para a determinação do pH, uma solução homogênea com a crueira foi preparada, seguindo a metodologia descrita por Pregnotatto e Pascuet (1985). Para a preparação da

solução homogênea, 10 g de amostra foram transferidas para um erlenmeyer de 250 mL e adicionados 10 mL de água destilada. A mistura foi agitada por meia hora e posteriormente deixada em repouso por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro erlenmeyer seco, no qual o pH dessa solução foi determinado com um medidor de pH devidamente calibrado.

4.1.4 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas na crueira foram pesados 5 g de amostra e realizado a incineração em mufla a 550°C. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Os procedimentos de aquecimento e arrefecimento da amostra foram repetidos até peso constante. O cálculo para a determinação do teor de cinzas foi desenvolvido através da Equação 02 (ZENEBO; PASCUET, 2005).

$$\frac{100 N}{P} = \% \text{ de cinzas} \quad (02)$$

Sendo:

N = peso em gramas de cinzas;

P = peso em gramas da amostra.

4.1.5 Determinação do teor de lipídeos

Para a determinação de teor de lipídeo na crueira foi utilizado o método de extração direta em Soxhlet. A amostra com 5 g de crueira em papel de filtro amarrado com barbante desengordurado foi transferida para o aparelho extrator Soxhlet. Este aparelho foi acoplado a um balão de fundo chato previamente tarado a 105°C por 1 h e adicionado éter para 1 Soxhlet e ½ sob o papel adaptado. Um condensador de bolas também foi adaptado ao extrator e o processo foi mantido sob aquecimento e em refluxo contínuo por 8 h, correspondendo a cinco gotas por segundos. Posteriormente, o balão volumétrico contendo o resíduo extraído foi transferido para a capela para evaporar o excesso de éter presente na amostra e em seguida para uma estufa a 105°C por um período de uma hora. O procedimento de remoção de solvente e pesagem da amostra foi repetido até massa constante. O cálculo para a determinação do teor de lipídeos foi desenvolvido através da Equação 03 (ZENEBO; PASCUET, 2005).

$$\frac{100 N}{P} = \% \text{ de lipídeos} \quad (03)$$

Sendo:

N = peso em gramas de lipídeos;

P = peso em gramas da amostra.

4.1.6 Determinação do teor de amido

O procedimento para determinação do teor de amido foi realizado através da padronização da solução de Fehling com uma solução padrão de glicose (5 g/L). Para a obtenção da solução de Fehling foram desenvolvidos uma solução A (5mL), composta por 3,46 g de sulfato de cobre dissolvidos em água destilada até completar o volume de 50 mL, e uma solução B (5 mL), composta por 17,3 g de tartarato duplo de potássio, 10 mL de uma solução contendo 5 g de hidróxido de sódio dissolvidos em água destilada para completar o volume de 50 mL, formando 10 mL de solução de Fehling para um erlenmeyer de 250 mL. Em cada erlenmeyer, foram inseridas 8 pérolas de vidro os quais foram titulados a quente com a solução padrão de glicose previamente preparada, utilizando como indicador da titulação o azul de metileno (CARVALHO *et al* 2002 *apud* CARVALHO *et al* 2006). O cálculo do título da solução de Fehling foi desenvolvido através da Equação 04 apresentada.

$$FC = \frac{V_{glicose} 0,5}{100} \quad (04)$$

V = volume em mL da solução da amostra gasto na titulação;

FC = título da solução de Fehling

Após o cálculo do título da solução de Fehling, foram pesados 2 g da amostra e adicionados 200 mL de água destilada que, posteriormente, foram transferidas para um erlenmeyer de 500 mL. Adicionou-se 1 mL de NaOH a 10% e, em seguida, a amostra foi aquecida em autoclave à temperatura de 121°C por uma hora e posteriormente resfriada à temperatura ambiente. Dez mL de HCl concentrado foram adicionados à amostra e novamente aquecida em autoclave a 121 °C por meia hora. O processo de resfriamento à temperatura ambiente foi repetido e a amostra foi neutralizada com uma solução de NaOH a 10%, sendo posteriormente transferida para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi completado com água destilada. A solução foi agitada para a homogeneização e mantida em repouso para iniciar o processo de sedimentação. O sobrenadante foi filtrado em papel seco e transferido para uma bureta de 25 mL.

A solução de Fehling, composta por 5 mL da solução A e 5 mL da solução B, foi titulada a quente em um erlenmeyer de 250 mL contendo 8 pérolas de vidro com a solução contida na bureta. O indicador azul de metileno foi adicionado antes do desaparecimento da cor de azul de metileno do sulfato de cobre e a titulação foi mantida até atingir o ponto de viragem. Através da titulação com a solução de Fehling, foi possível quantificar a quantidade de glicose produzida e a conversão da glicose em amido foi calculada através da Equação 05.

$$\frac{FC \times 500 \times 100 \times 0,9}{V \times P} = \text{Amido}(\%) \quad (05)$$

Sendo:

$$FC = \frac{V_{glicose} \times 0,5}{100}$$

V = volume em mL da solução da amostra gasto na titulação;

P = peso da amostra.

4.1.7 Determinação dos teores de fibra bruta e proteínas

A determinação dos teores de fibra bruta e proteínas foi realizada no Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS) em Aracaju SE, seguindo os métodos IAL (2005) 044/IV e Kjeldahl, respectivamente.

4.2 Produção do extrato bruto da enzima

4.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse trabalho foi isolado a partir de manguezais em trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Industrial do Departamento de Engenharia Química (DEQ) do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A cepa compreende uma bactéria Gram positiva na forma de bacilo, a qual foi identificada como *Bacillus* sp. A cepa ANRAS02 é mantida sob refrigeração em tubos de ensaio contendo ágar nutriente e sob congelamento em meio *skim milk*.

4.2.2 Preparo do meio de produção da enzima

Foram adicionados 1 g de amido solúvel em um erlenmeyer de 150 ml, 4,25 ml de uma solução tampão para a correção do pH e 4,25 ml de uma solução nutriente composta por MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, FeSO₄ e extrato de levedura, para atender às necessidades

nutricionais do microrganismos. Os erlenmeyers contendo o meio de produção foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atm e temperatura de 121°C.

4.2.3 Fermentação submersa

Para a obtenção da enzima através de processo de fermentação, a cepa *Bacillus* sp. ANRAS02 foi preparada na forma de um pré-inóculo e, posteriormente, de um inóculo até a obtenção da quantidade de células vivas necessárias para iniciar o processo fermentativo. Uma alíquota com 5 mL do inóculo padronizado (5×10^7 células/mL) foi adicionada ao meio de produção. Após 24:00 horas de incubação a temperatura de 37 °C, a enzima foi centrifugada a 4200 rpm por 15 minutos para a obtenção do extrato bruto, conforme o esquema simplificado de fermentação submersa da Figura 07.

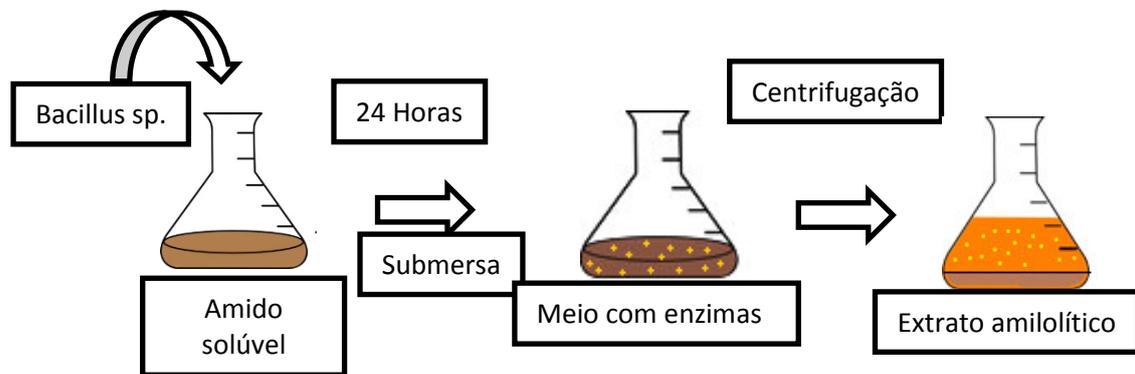


Figura 07: Esquema simplificado de produção do extrato enzimático

4.2.4 Cálculo da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática foi desenvolvido um teste quantitativo de amido pelo método descrito por de FUWA (1954), com modificações, para a atividade dextrinizante do amido. Foi preparada uma solução padrão de amido com concentração equivalente a 5 g/L, que foi posteriormente gelatinizada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução de amido padrão, 1,6 mL de uma solução tampão 5,5, para correção do pH, e 2 mL do extrato enzimático bruto. A mistura foi aquecida a 65 °C por 25 minutos para que ocorresse a reação de hidrólise enzimática. Em seguida, foram adicionados 1 mL da solução hidrolisada e 2 mL da solução de iodo em um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume do balão completado com água destilada. Para a determinação da quantidade de amido na solução controle, foram adicionados 0,5 mL da solução de amido padrão e 2 mL da solução de iodo em um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume do balão completado com água destilada. Para a

determinação da quantidade de amido residual presente no extrato enzimático, foram adicionados 0,5 mL do extrato contendo enzimas e 2 mL da solução de iodo em um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume do balão completado com água destilada. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm e os valores obtidos e da solução controle foram utilizados para o cálculo da atividade enzimática através da Equação 06, proposta por Xiao *et al* (2006) com modificações.

$$U/mL = \frac{(A_{\text{controle}} + A_{\text{inicial}} - A_{\text{amostra}})}{(0,153 \times T \times 0,01 \times 0,33)} \quad (06)$$

Sendo:

A controle = absorvância da solução controle de amido

A amostra = absorvância da amostra de extrato enzimático reagido;

A inicial = absorvância do amido residual presente no extrato enzimático

T = tempo de reação da amostra com a solução de iodo.

4.3 Processo de sacarificação da crueira

O estudo do processo de sacarificação foi realizado através de um Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 (Tabela 06), com três repetições no ponto central e pontos axiais para analisar a quantidade de extrato enzimático bruto e a concentração de crueira no processo de sacarificação, bem como suas interações no sistema para a obtenção da variável resposta dependente ° Brix (Tabela 07).

Cada ensaio ocorreu em batelada usando erlenmeyer de 250 mL, ao qual foi inserida inicialmente a massa de crueira pré-tratada, conforme item 4.1.1.

O processo de sacarificação seguiu a metodologia descrita por Rabalho (2002) com modificações. Na primeira etapa do processo de sacarificação foram adicionados 10 mL do extrato bruto durante uma hora, a 60°C, sob agitação de 100 rpm, e, posteriormente, os hidrolisados foram aquecidos em autoclave à pressão de 1 atm e a temperatura de 121°C para que ocorra a gelatinização do amido da crueira. Após essa etapa, o sistema sofreu arrefecimento até a temperatura ótima de atuação da enzima, 60°C, e o volume correspondente de extrato enzimático bruto foi adicionado conforme demonstrado na Tabela 06, sendo o volume total de 150 mL completado com água destilada. O processo de hidrólise em todos os ensaios foi desenvolvido com agitação de 150 rpm, pH 5,0 e na temperatura de 60°C, durante 24:00 horas. Foram retiradas alíquotas de 10 mL para a realização de análises de sólidos solúveis (°Brix).

Tabela 06: Valores reais das variáveis utilizadas no Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 para sacarificação da crueira.

Variável / Nível	-1,41	-1	0	1	1,41
Volume do extrato bruto de enzima (mL)	41,8	50	70	90	98,2
Concentração de crueira (g /L)	51,8	60	80	100	108,2

Tabela 07: Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 para sacarificação da crueira

Ensaio	Volume do extrato enzimático bruto (mL)	Concentração da crueira (g/L)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

4.3.1 Determinação do °Brix

A sacarificação foi analisada baseada nos sólidos solúveis (°Brix) presentes nas etapas iniciais e finais do processo. Foram retiradas alíquotas de 1 mL do hidrolisado para medir o °Brix da mistura com refratômetro manual, seguindo a metodologia proposta por Agustini e Junior (2007).

4.4 Determinação da cinética de sacarificação

Para o desenvolvimento da cinética de sacarificação do amido da crueira, foi usado o melhor resultado encontrado para o planejamento experimental descrito no item 4.3 e reproduzido em triplicata. A cinética foi analisada através do acompanhamento do °Brix com retiradas de amostras a cada 4:00 horas, durante um tempo total de 44:00 horas de sacarificação.

4.5 Processo de fermentação alcoólica

Para realizar a fermentação alcoólica, um volume de 150 mL da solução de crueira hidrolisada, obtida nas condições ótimas e autoclavada, foi inserido em erlenmeyer com capacidade de 500 mL, juntamente com 3 g de fermento comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), dissolvidos em 50 mL de água destilada. A essa mistura também foi adicionada uma solução de sais composta por 0,25 g/L de $MgSO_4$, 2 g/L de $(NH_4)SO_4$ e 2 g/L KH_2PO_4 , completando o volume final para 200 mL, conforme o esquema simplificado apresentado na Figura 08 (LIMA *et al*, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram usados para a determinação da média e do desvio padrão de cada ponto. O tempo de fermentação foi de 48:00 horas a temperatura de 34 °C, com agitação de 150 rpm e pH 5,5. Nas etapas iniciais e finais do processo fermentativo foram retiradas alíquotas de 10 mL do fermentado para a realização das análises de sólidos solúveis e concentração de açúcares redutores em cada dia de fermentação.

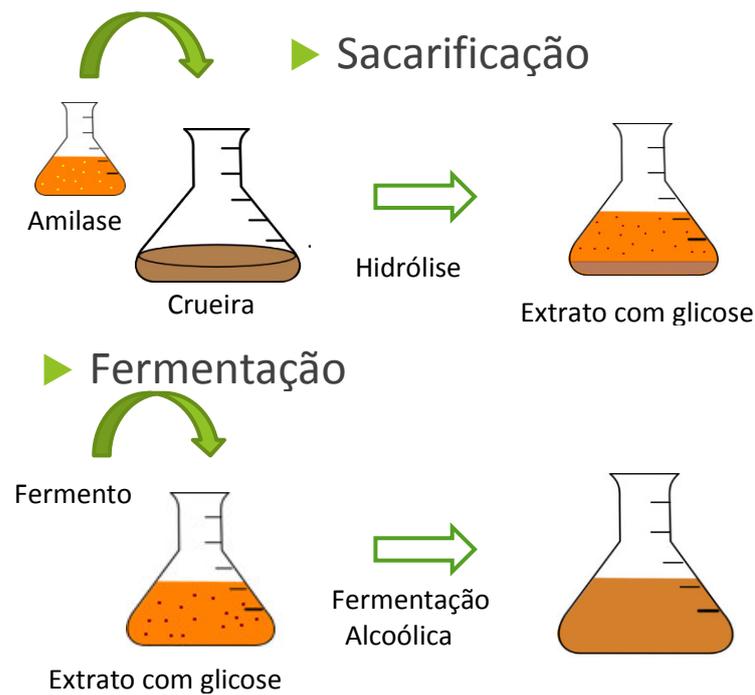


Figura 08: Esquema simplificado do processo de fermentação alcoólica

4.5.1 Determinação da cinética de fermentação alcoólica

Para o desenvolvimento da cinética de fermentação alcoólica, foi desenvolvido 1000 mL de fermentado nas mesmas condições do item 4.5, em um reator batelada. O ensaio foi analisado nos tempos 00:00, 24:00, 48:00, 72:00, 96:00 e 120:00 horas de fermentação, retirando-se 60 mL do fermentado alcoólico para a destilação simples e posteriormente analisados os parâmetros sólidos solúveis, teor de etanol e concentração de açúcares redutores.

4.6 Análises

4.6.1 Determinação do °Brix

A determinação do °Brix foi desenvolvida conforme o item 4.3.1.

4.6.2 Determinação dos açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método de ácido dinitrossalicílico (DNS), seguindo o método descrito por Miller (1959). Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução DNS juntamente com 1 mL do mosto fermentado, deixando-se reagir a temperatura de 90 °C, durante 5 minutos. Após essa etapa, a amostra foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e completado com água destilada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 480 nm e os valores obtidos pelas absorvâncias possibilitou o cálculo da quantidade de açúcares redutores presente no mosto fermentado através da Equação 07 previamente elaborada.

$$A = 0,1228 Y \quad (07)$$

$$R^2 = 0,9958$$

Sendo:

A= Absorbância medida a 480 nm,

Y= concentração de Açúcares redutores (g/L)

4.6.3 Determinação do teor de etanol

A análise da porcentagem de etanol presente no meio foi realizada a 600 nm por espectrofotômetro com base na metodologia desenvolvida por Magrí *et al* (1997), com modificações. A determinação do teor de etanol ocorreu a partir da análise de redução do cromo VI (laranja) em cromo III (verde). O etanol reage com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), produzindo cromo III e ácido acético na presença de um ácido atuando como doador de hidrogênios. Após a reação, na presença do ácido concentrado, a solução apresenta a cor verde e a fonte de dicromato de potássio e ácido é a solução sulfocrômica que apresenta o $K_2Cr_2O_7$ a 20 g/L e ácido sulfúrico com 98% de pureza a 34 g/L. Para isso, os ensaios foram destilados e 1 mL da amostra reagiu com 1 mL da solução sulfocrômica, a 30°C durante 15 minutos. Os resultados foram calculados a partir da Equação 08 gerada pela curva de calibração descrita abaixo.

$$A = 0,2669 X + 0,0726 \quad (08)$$

$$R^2 = 0,9971$$

Sendo:

A= Absorbância medida a 600 nm,

X= % de etanol da amostra

4.6.4 Caracterização do etanol

Foram utilizados 100 mL do etanol produzido a partir da crueira nas condições ótimas determinadas. As análises físico-químicas foram realizadas através de um densímetro manual, peagâmetro de bancada e condutivímetro para os respectivos parâmetros: massa específica, pH e condutividade elétrica. Os ensaios foram realizados de acordo com o padrão exigido pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) através do Regulamento Técnico ANP nº3/2011, anexo da Resolução ANP Nº7 de 9 de fevereiro de 2011.

5.0 RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1 Resultados das análises físico-químicas

O processo de secagem e homogeneização da crueira no liquidificador foi importante para o desenvolvimento das análises físico-químicas e para a realização dos ensaios de sacarificação. O processamento do resíduo permitiu a formação de uma farinha de cor branca apresentando textura de partículas finas, conforme a Figura 09.



Figura 09: Resultado da crueira seca

A formação da farinha de crueira permitiu um aumento na superfície de contato, facilitando a penetração do calor e o ataque dos ácidos durante a sacarificação do amido para a caracterização físico-química e o melhor rendimento de gelatinização do amido para os ensaios do planejamento experimental.

Na Tabela 08 estão apresentados os resultados dos experimentos com os valores médios e desvio padrão para cada parâmetro analisado na caracterização físico-química da crueira.

Tabela 08: Resultados dos parâmetros analisados para caracterização da crueira

Parâmetros	Resultados
Umidade (%)	30,06 ± 0,46
Cinzas (%)	1,52 ± 0,03
Lipídeos (%)	0,54 ± 0,03
Fibra bruta (%)	3,43 ± 0,23
Proteínas (%)	2,19 ± 0,16
Amido (%)	82,00 ± 0,58
pH	5,00 ± 0,20

Analisando a composição físico-química da crueira apresentada por Neves (2004) os resultados obtidos na Tabela 08 divergem no que diz respeito ao teor de umidade ($15,5 \pm 0,10$ %), cinzas ($0,9 \pm 0,02$ %), fibra ($7,39 \pm 0,010$ %) e proteína ($1,41 \pm 0,01$ %). Entretanto, os demais valores analisados são semelhantes, sendo o teor de amido ($81,1 \pm 0,18$ %), lipídeos ($0,44 \pm 0,01$ %) e pH (5,4). As diferenças apresentadas estão relacionadas com as características biológicas da crueira analisada, bem como as questões climáticas e de solo de cada região de produção da mandioca.

A crueira apresentou uma maior percentagem de amido ($82,0 \pm 0,58$) quando comparado ao estudo realizado por Carvalho (2005) que analisa a composição físico-química de resíduos agroindustriais da mandioca. Carvalho (2005) demonstram um teor de amido para o farelo de mandioca (73-78 %) e descreve a crueira como “farinhão” com valores de (68-48%). Os resultados para o pH e o teor de cinza apresentam resultados semelhantes (5,39 e 1,06) respectivamente, divergindo dos demais valores obtidos na Tabela 08.

De acordo com os estudos realizados por Camilli (2007), a manipueira, resíduos líquidos obtidos durante a produção da farinha de mandioca, o teor de amido encontrado foi de 1,17%, o que retrata um percentual menor que o valor obtido na Tabela 08. Porém, a composição química da raiz de mandioca estudada por Venturini Filho e Mendes (2003) apresentou um teor de amido de (82,5%), um percentual praticamente igual ao apresentado pela crueira no presente trabalho.

Através da caracterização físico-química da crueira, foi possível perceber que esse resíduo apresenta um alto teor de amido, tornando-o com alto potencial para ser utilizado em processo de bioconversão e transformado em produtos de valor agregado, como é o caso do etanol de segunda geração.

5.2 Resultados do processo de sacarificação enzimática

A Tabela 09 evidencia os resultados obtidos no estudo do processo de sacarificação enzimática da farinha de crueira para os ensaios do planejamento experimental, conforme apresentado na Figura 10. Os resultados do planejamento experimental demonstram que houve aumento dos sólidos solúveis (°Brix) do processo de sacarificação. Para o presente estudo foi utilizado um extrato enzimático bruto em 24:00 horas de fermentação que obteve 30,72 U/mL de enzima no extrato.

Tabela 09. Resultado do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2²

Ensaio	°Brix Inicial	Primeira Etapa	Segunda Etapa	°Brix Final
1	1	2	7	7
2	2	2	6	6
3	1	2	4	10
4	2	2	3	9
5	1	2	5	7
6	2	2	4	8
7	1	3	4	6
8	2	2	3	10
9	1	2	7	7
10	1	2	10	8
11	1	2	7	8



Figura 10: Ensaios do planejamento experimental

A pequena variação de °Brix entre a etapa do °Brix inicial e a primeira etapa representam uma pré-sacarificação, que caracteriza a necessidade de um processo efetivo de gelatinização do amido, tendo em vista que essa fase foi realizada a 60 °C, durante 1 hora. Após a gelatinização do amido da crueira na autoclave e adição de 40 mL de extrato enzimático na segunda etapa, foi evidenciado um aumento na variação do °Brix, sendo que os ensaios 3 e 8 apresentaram variações de 6 °Brix e 7 °Brix, respectivamente.

Os resultados obtidos dessas variações são semelhantes ao resultado final apresentado por Augustini e Junior (2007) que desenvolveram um processo de sacarificação da mandioca a partir de enzimas comerciais obtendo resultados de 9 para o valor do °Brix no hidrolisado.

No entanto, o maior valor de °Brix final obtido na sacarificação (10 °Brix), Tabela 09, é menor que o resultado apresentado por Neves (2004), 19 °Brix, que desenvolve uma sacarificação enzimática da crueira utilizando uma enzima comercial. A diferença dos valores da literatura em relação aos apresentados na Tabela 09 era esperada, tendo em vista que foi utilizado um extrato enzimático bruto com a presença de resíduos celulares da produção bacteriana de enzima.

Os resultados dos °Brix de cada experimento do planejamento experimental foram analisados através do Software *Statistic 7.0* para que se pudesse verificar as influências das variáveis concentração de crueira (g/L) e volume de extrato (mL) nos resultados de sólidos solúveis (°Brix).

Na Tabela 10 foi possível identificar o efeito da influência estatística das variáveis com 95% de confiança, sendo apenas a variável independente concentração de crueira (g/L), representada por X_2 , estatisticamente significativa diante da resposta açúcares totais (°Brix). A variável independente volume de extrato enzimático (mL) representada por X_1 não foi considerada significativa, pois os parâmetros (p-valor) foram maiores que 5%.

Tabela 10: Efeito estatístico das variáveis crueira e volume de extrato no Planejamento Fatorial Completo 2^2

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	Estimativa por intervalo (95%) limite inferior	Estimativa por intervalo (95%) limite superior
Média	7,67	0,3884	19,736	0,000006	6,668	8,66
X_1 (L)	-0,1464	0,475	-0,307	0,7706	-1,3694	0,538
X_1 (Q)	-0,0416	0,5662	-0,0735	0,9441	-1,4973	0,7065
X_2 (L)	2,914	0,4757	6,125	0,00168	1,6912	2,068
X_2 (Q)	0,4583	0,5662	0,809	0,45506	-0,99731	0,9569
X_1X_2	0,00	0,6728	0,00	1,000	-1,7295	0,8647

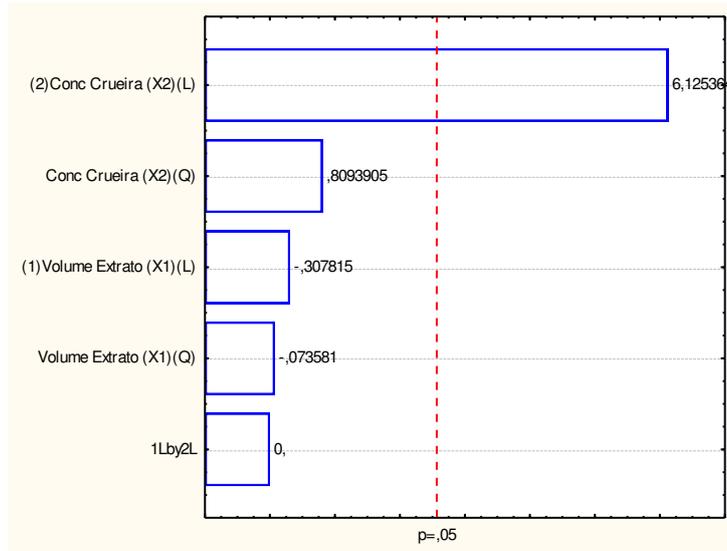


Figura 11: Gráfico de Pareto obtido a partir do Planejamento Fatorial Completo 2^2 para sacarificação da crueira

A partir da Tabela 10 e da Figura 11 foram desenvolvidos os termos lineares (L) e quadráticos (Q) e descrito o modelo ajustado conforme a Equação 09.

$$^{\circ}\text{Brix} = 7,67 + 2,91X_2 \quad (09)$$

Sendo:

$^{\circ}\text{Brix}$ = Sólidos solúveis totais,

X_2 = Concentração de crueira (g/L)

Tabela 11: Análise de variância para a resposta $^{\circ}\text{Brix}$ no Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	P - valor
Regressão	17,37	1	17,37	69,48	0,000006
Resíduo	2,26	9	0,25		
Total	19,63	10	1,963		

% variação explicada (R^2)= 0,88473; $F_{1;9;0,05}=5,12$

A Tabela 11 apresenta o F_{cal} para a regressão de 69,48 sendo maior que o F_{tabelado} , o que significa que o modelo proposto representa estatisticamente o processo desenvolvido e a variação explicada (R^2) de 88,47 % demonstra que o modelo está adequado aos dados experimentais.

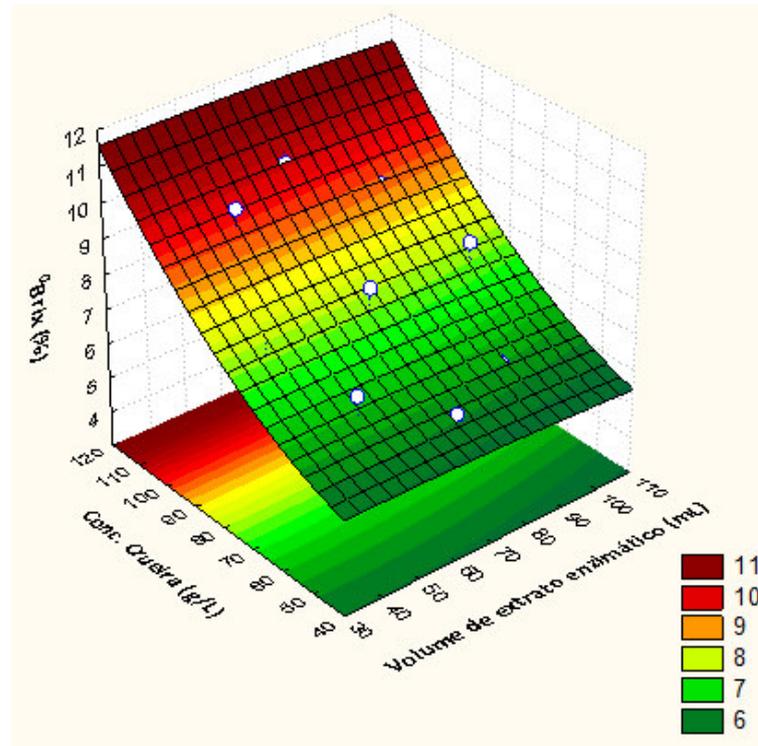


Figura 12: Superfície de resposta obtida no Planejamento Experimental Fatorial

Completo 2^2

A melhor faixa de sacarificação obtida foi de 100 a 108 g/L de crueira e com 50 a 70 mL de extrato enzimático, os quais apresentaram as maiores variações de °Brix ao final de 24:00 horas de hidrólise. Os resultados apresentados pelo programa *Statistic 7.0* demonstram a possibilidade de atingir valores máximos de 12 °Brix ao final do processo, conforme apresentada pela Figura 12.

É importante destacar que para atingir valores maiores de °Brix é necessário aumentar a concentração de crueira (g/L), sendo verificado que há um aumento significativo da textura do material após o processo de gelatinização, dificultando a coleta de amostra para a realização das análises.

5.3 Resultados obtidos na cinética de sacarificação

A cinética foi desenvolvida após a segunda etapa do planejamento experimental, com a adição do volume total de extrato. O ensaio 03 do planejamento experimental foi selecionado por apresentar concentração de crueira de 100 g/L e possibilitar o melhor manuseio para retirada de amostras quando comparado ao ensaio 08 que resultou em variações semelhantes.

O tempo de sacarificação foi de 44:00 horas e o acompanhamento do processo ocorreu com a retirada de alíquotas para a medição dos açúcares totais (°Brix) a cada 4:00 horas de processo, conforme os resultados da Figura 13.

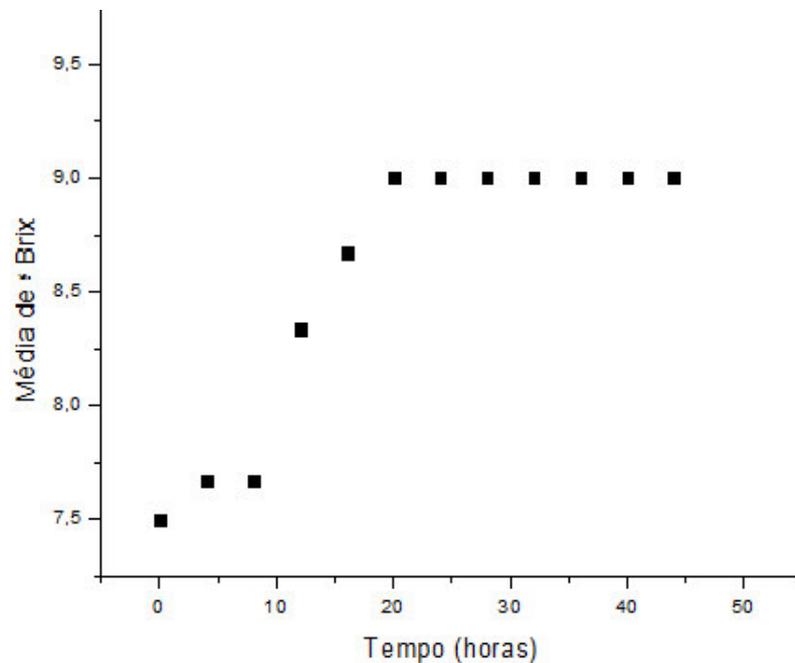


Figura 13: Resultado da cinética de sacarificação do amido da crueira com concentração de 100 g/L a 60 °C

Na Figura 13 é possível verificar que a partir de 20:00 horas de sacarificação os valores de sólidos solúveis dos ensaios atingiram 9 °Brix, permanecendo constantes até o tempo final de sacarificação (44:00 horas). É notório que durante a sacarificação não foram obtidos valores de variação de °Brix significativos como os resultados apresentados na Tabela 09, fato este caracterizado pela diminuição dos valores de unidades de enzima obtidos para os ensaios de sacarificação, apresentando 17,0 U/mL de enzima no extrato.

A crueira utilizada para o desenvolvimento da cinética enzimática foi proveniente de uma safra diferente da utilizada nos ensaios do planejamento experimental. Com isso, torna-se possível admitir a hipótese da existência de substâncias que promovem a diminuição da atividade enzimática durante o processo de sacarificação do amido, reduzindo essa variação de °Brix. Tais compostos podem ser agrotóxicos ou fertilizantes adicionados durante o cultivo da mandioca.

5.4 Resultado do processo de fermentação alcoólica

Com o desenvolvimento da cinética foi possível obter a redução do tempo de 24:00 horas de hidrólise para 20:00 horas, sendo esse tempo utilizado para os ensaios posteriores de fermentação alcoólica.



Figura 14: Fermentação em triplicata dos hidrolisados

Tabela 12: Resultado dos parâmetros analisados para fermentação alcoólica

Parâmetros	Média dos resultados (horas)		
	00:00	24:00	48:00
Sólidos solúveis (°Brix)	7,5 ± 0	7,0 ± 0	7,0 ± 0
Açúcares reduzores (g/L)	11,36 ± 1,85	8,24 ± 0,77	6,82 ± 0,96

Para a fermentação alcoólica, foram realizados ensaios em triplicata na faixa ótima de hidrólise do amido da crueira, por um período de 20:00 horas, conforme a Figura 14. Aliquotas do fermentado foram retiradas para a análise de sólidos solúveis (°Brix) e açúcares redutores (AR), após o tempo de fermentação de 00:00, 24:00, 48:00 horas e analisadas, conforme apresentado na Tabela 12. É possível notar um decréscimo de açúcares redutores que foram consumidos pelo microrganismo durante o tempo de 24:00 e 48:00 de fermentação e uma variação de sólidos solúveis de 0,5°Brix no tempo de fermentação de 24:00 h. Mediante os resultados da triplicata, foi desenvolvida nas mesmas condições, uma fermentação em um reator em batelada, conforme a Figura 15, com volume total de 1000 mL, para que pudesse

ser realizada a destilação simples de 60 mL do fermentado a cada dia de fermentação, até o tempo final de 120:00 horas.



Figura 15: Fermentação no reator em batelada

A Figura 16 apresenta os resultados das análises desenvolvidas durante o experimento de fermentação alcoólica para o estudo da cinética no reator em batelada. Comparando os resultados de sólidos solúveis da triplicata e do reator, verifica-se um comportamento semelhante para o parâmetro sólidos solúveis até o período de 96:00 horas de fermentação, com decréscimo de 0,5 °Brix em 24:00 horas e posteriormente manteve-se constante com 7 °Brix, atingindo valores de 6,5 °Brix no tempo de 120:00 horas.

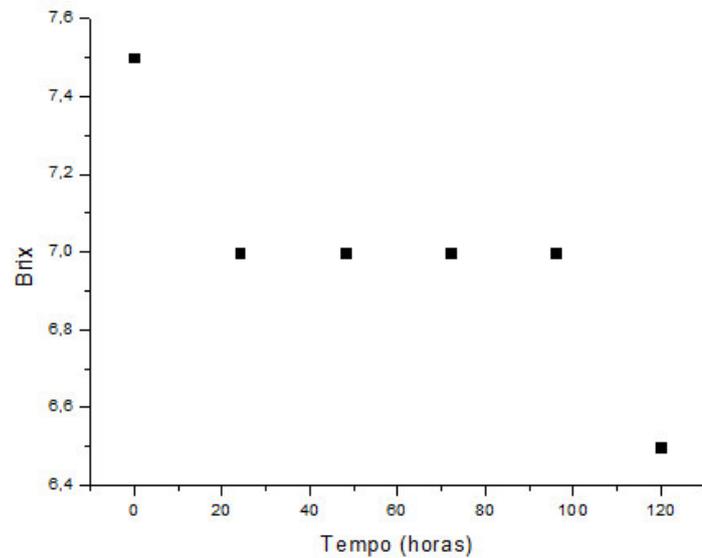


Figura 16: Resultado dos sólidos solúveis da cinética da fermentação alcoólica no reator batelada

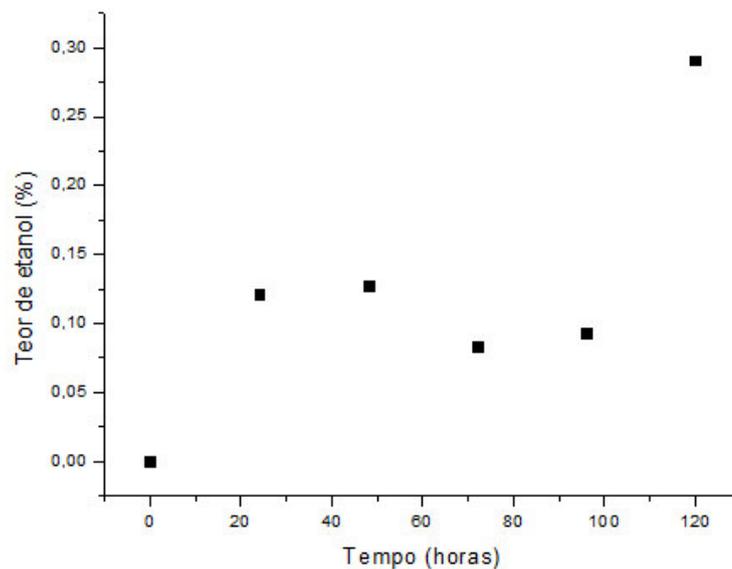


Figura 17: Resultado do teor de etanol da cinética da fermentação alcoólica no reator batelada

O consumo de açúcares evidenciado pela variação de 0,5 °Brix apresentou concordância com os resultados de produção de etanol nos tempos de 24:00 e 120:00 horas. Nesses períodos, é possível calcular através da Equação 08 a produção de 0,121% e 0,291% de etanol respectivamente, conforme apresentado na Figura 17. Nos períodos de 48:00 e 72:00

horas, houve uma pequena oscilação dos resultados, sendo justificada pela retirada de amostras em diferentes dias de fermentação.

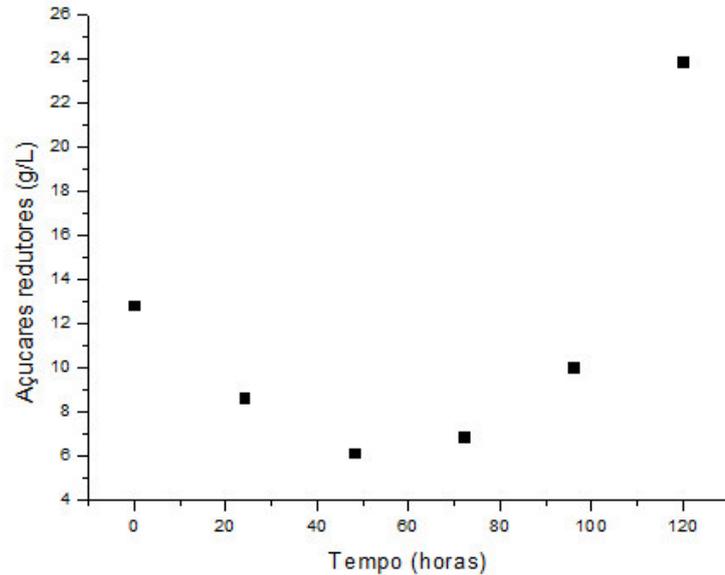
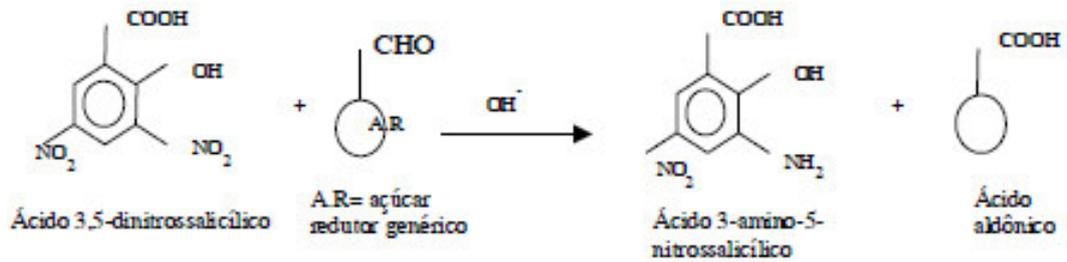


Figura 18: Resultado dos teores de açúcares redutores na cinética da fermentação alcoólica no reator em batelada

A Equação 07 gerada pela curva de calibração, permitiu o cálculos dos valores obtidos de açúcares redutores que apresentaram um decréscimos até o período de 48:00 horas, conforme identificado nos ensaios em triplicata. Entretanto, entre o período de 48:00 a 120:00 horas, foi possível medir o crescimento desses açúcares, o que permite evidenciar que, possivelmente, houve reação de outro açúcar redutor com o DNS (Figura 18). A Figura 19 apresenta a reação do ácido 3,5-dinitrossalicílico com açúcares redutores genéricos, sendo possível então a reação do DNS não apenas com a glicose e frutose, podendo reagir com outros tipos de açúcares redutores como a maltose, que não são fermentescíveis.



Fonte: ASQUIERI *et al* (2003)

Figura 19: Reação do DNS com açúcares redutores genéricos

Apesar da metodologia de espectrometria ser mais precisa que a medição por refratômetro, a quantidade de açúcares medidos pela metodologia DNS foram incertas, sendo esta metodologia não adequada ao trabalho proposto.

Tabela 13: Resultado dos parâmetros analisado para a caracterização do etanol

Parâmetros	Resultados da caracterização do etanol da crueira	Características do etanol a partir da cana de açúcar
Cor	amarelo	Incolor
Massa específica (Kg/m ³)	991	Máximo 811
Condutividade elétrica (μs/m)	30910	Máximo 350
pH	4,0	6 a 8

Os parâmetros analisados na caracterização do etanol são apresentados na Tabela13. Por meio de uma análise visual do destilado, foi verificado que o álcool apresentou um aspecto amarelado devido à possibilidade de arraste da substâncias oriundas da fermentação durante o processo de destilação, diferenciando-o do etanol produzido por cana-de-açúcar que apresenta ausência de coloração aparente. Os parâmetros pH e condutividade elétrica foram medidos através de peagâmetro de bancada e condutivímetro, devidamente calibrados. Os resultados divergiram dos valores esperados para o etanol de cana-de-açúcar, sendo 6 a 8 para valores de pH e 350 μs/m para a condutividade elétrica. Para a obtenção da massa específica o valor obtido em g/L foi multiplicado por 100, resultando em 991 kg/m³, valor acima do limite esperado para o etanol hidratado (811 kg/m³). As divergências de resultados estão relacionadas ao baixo teor de etanol presente na amostra, sendo essas especificações para etanol com teor alcoólico de 95 a 96 % de pureza.

6.0 CONCLUSÃO

- Através do estudo realizado é possível concluir que a caracterização físico-química da crueira, demonstrou um alto teor de amido ($82,00 \pm 0,58$ %) e baixo teor de cinzas ($1,52 \pm 0,03$ %) o que a torna a crueira um substrato potencial para processos biotecnológicos de bioconversão;
- O extrato enzimático bruto produzido apresentou eficiência no processo de sacarificação, obtendo valores de 10 °Brix na faixa de 100 a 108 g/L de crueira e 70 mL de extrato enzimático bruto, concordando com os valores de °Brix encontrados na literatura;
- O processo de fermentação alcoólica do hidrolisado apresentou uma queda nos valores de °Brix nos períodos de 24:00 e 120:00 horas e a produção máxima de etanol foi de 0,291%, evidenciando a necessidade de otimização desse processo em trabalhos futuros, pois estão abaixo dos apresentados pela literatura, como apresentado no trabalho de Tambourgi *et al* (2010), os quais otimizaram a produção de etanol a partir da mandioca, obtendo rendimentos de produção próximos a 45%;
- Diante do baixo teor de etanol produzido nesse estudo, os resultados da caracterização do biocombustível foram divergentes dos obtidos no etanol de primeira geração a partir da cana-de-açúcar.

7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Para trabalhos futuros, uma sugestão seria desenvolver um melhoramento genético do microrganismo *Bacillus* sp. ANRAS02, visando uma super expressão do gene responsável pela produção da enzima e conseqüentemente a obtenção de atividade enzimática que proporcione maiores conversões de amido em açúcares fermentescíveis;
- Outra sugestão seria o desenvolvimento do processo de hidrólise enzimática a partir de uma associação de enzimas como outras amilases, alfa, beta e dextrinases, para aumentar a taxa de sacarificação do amido;
- Seria conveniente aprimorar o extrato bruto enzimático através de uma purificação utilizando operações de filtração para remoção dos resíduos celulares e posteriormente a sua concentração, permitindo assim o processo de imobilização de enzimas;
- Com a otimização e o aumento do teor de etanol, existe a possibilidade de desenvolver outros produtos de valor comercial como o vinagre a partir do etanol produzido por crueira.

8.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUSTINI, D.; JUNIOR, H. E. Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural. **Synergismus scyentifica UTFPR**, p.1-4, 2007.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol-Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciências. Campinas**, p.1-16, 2006.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP N° 7, de 09/02/2011 - Publicada no Diário Oficial da União em 10/02/2011 – Retificada no Diário Oficial da União 14/04/2011.

ARAUJO, G. J. F.; NAVARRO, L.F.S.; SANTOS, B.A.S. O etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, n.5. p.01-11, 2013.

ARAUJO, J. S. P.; LOPES, C. A. Produção de farinha de mandioca na agricultura familiar. **Manual técnico programa Rio Rural**. Niterói – RJ. ISSN1983-5671.2009.

ARAUJO, N.C.; GUIMARÃES, P.L. F.; OLIVEIRA, S.J.C.; LIMA, V. L. A.; BANDEIRA, F.A.; ARAÚJO, F. A. C. Quantificação da geração de resíduos em uma casa de farinha no Estado da Paraíba. **Revista do Centro Natural e Exata**, v.13, n.15, p.3793-3799, 2014.

ASQUIERI, E. R.; SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. A. X.; ASSIS, E. M. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, Sept./Dec. 2003.

BARBOSA, M. Z. Biocombustíveis e Commodities Agrícolas. **Instituto de Economia Agrícola**, v.9, n.7, p.1-4, 2014.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das reações sacaríneas amiláceas e lignocelulósicas do sorgo sacarino (Sorghum bicolor (L.) Moench) para a produção de bioetanol**. 2012. 334f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 2012.

BNDES; CGEE – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. p. 154. 2008.

Disponível em: http://www1.cgee.org.br/arquivos/bioetanol_port.pdf?idProduto=4809

Acesso: 01/04/2015.

BRASIL. Decreto -Lei nº 62/2006 , de 21 de março de 2006.

Brasil. TCU- Tribunal de contas da União. Relatório de levantamento – Mercado Interno de etanol. p.25, 2012. Disponível em:

[http://portal3.tcu.gov.br/portal/page/portal/TCU/comunidades/regulacao/areas_atuacao/apresentacoes/Mercado_Interno_Etanol_Web%20\(3\).pdf](http://portal3.tcu.gov.br/portal/page/portal/TCU/comunidades/regulacao/areas_atuacao/apresentacoes/Mercado_Interno_Etanol_Web%20(3).pdf)

Acesso em: 07/06/2016.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciências Agrotécnica**, v. 31, n.02, p.429 -432, 2007.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia e Agricultura**, v. 20, n.04, p.36 -52, 2005.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coords). **Biotecnologia Industrial**, 1º ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, p.1-43.

CAMILI, E. A. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem uso de agentes químicos**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP, Brasil, 2007.

CARVALHO, G.G.P.; FERNANDES, F. E. P.; PIRES, A. J. V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais (Determination methods of starch and pectin levels in animal feeds). **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v. 08, n. 1, p.1-12, 2006.

CARVALHO, J. O. M. **Subprodutos da mandioca - Composição dos resíduos sólidos**. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 2005. Disponível em: http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/folder_mandioca.pdf
Acesso em: 27/03/2015.

CHIEPPE JUNIOR, J. B. **Tecnologia de fabricação do álcool**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiás. Inhumas, GO. 2012.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. **Estudo do processo de fabricação da farinha de mandioca**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, 2006.

CINELLI, B. A. **Produção a partir da fermentação simultânea a hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 2012.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção da alfa-amilase por *aspergillus niger* em resíduo de casca de mandioca. **UNOPAR- Ciências Biológicas e Saúde**. v.13, n.4, p- 245-249, 2011.

COLLARES, R. M. **Otimização do processo de hidrólise da mandioca in “natura”, com o uso de enzimas amilolíticas e pectinolítica**. 2011. f-8. Dissertação (mestrado em Engenharia de Processo). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS, Brasil, 2011.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira – cana-de-açúcar**. Monitoramento Agrícola, v.2, n.2, safra 2015/16, agosto 2015.

COSTA, L. A. **Caracterização do resíduo da fabricação de farinha de mandioca e se aproveitamento no desenvolvimento de alimento em barra**. 2004. F.69. Dissertação

(Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, Brasil, 2004.

COSTA, R. C.; MENDES, A. P. A. Mercado Brasileiro de biodiesel perspectivas futuras. **BNDES Setorial** 31, p-253-280, 2010.

CURCELLI, F.; BICUDO, S. J.; ABREU, M. L.; AGUIAR, E.B.; BRACHTVOGEL, E.L. Uso da mandioca como fonte de na dieta de ruminantes domésticos. **Revista raízes amidos tropicais**. v.4, p. 66-80, 2008.

DERMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Sila Science and Energy**, n.24, p.1016- 2016, 2008.

DUNHAM, F. B.; NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y. A Corrida Tecnológica pelos Biocombustíveis de Segunda Geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**, n 31,p. 5-48,2010.

DURÃES, F. O. M. Biocombustíveis reais questões para a equação Brasil de desenvolvimento sustentável. **Revista Política Agrícola**. Ano XVII, n.01, p. 129-131, 2008.

ESPÍNDOLA, A. A. Processo de certificação do etanol brasileiro. **Revista de Ciências Gerenciais**, v.13, n.17, p-113-130, 2009.

FERREIRA, G. B.; MELO, V. V.; ALMEIDA, J. B. O; EVANGELISTA, A. F.; SOUZA, R. R. Caracterização do processo de obtenção de uma aguardente de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 5, p. 2-7, 2005.

FERREIRA, V. R. S.; PASSADOR, C. S. O cenário sobre biocombustíveis, políticas públicas e sustentabilidade na produção científica nacional e internacional: a Internacionalização das pesquisas do Brasil? XXXVIII Encontro do ANPAD. Rio de Janeiro, 2014.

FILHO, W. P. C.; ALVES, H. S. Produção e Mercado de Mandioca: análise de preços ao produtor. **Revista Informações Econômicas**, v.34, n. 9, p. 47-52, 2004.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amyloses as the substrate. **Journal Biochem**, v.4, p.583-603, 1954.

GIOVANINI, G. T. **Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis Koningii***. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil 2014.

GOMES, C. F. S.; CHAVES, M. C. C. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Revista Production Produção**, v. 24, n.3, p.495-507, 2014.

GONÇALVES, S. Z. S.; CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRAO, M.; SANATANA, R. S. M.; SANTOS, L. S. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde**, v.1, n.4, p.245-24, 2011.

GORDINHO, M. C. **Do álcool ao etanol: trajetória única**. Revista ÚNICA 2010. Editora: Terceiro Nome, São Paulo, SP. 2010.

HANSEN, M. R.; BLENNOW, A.; PEDERSEN, S.; NORGAARD, L.; ENGELSEN, S. B. Gel texture and chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.8, p.1551-1566, 2008.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística de Produção Agrícola. Levantamento sistemático da produção agrícola, janeiro, 2016. Disponível em:

ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201601.pdf
f Acesso em: 22/08/2016

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4º. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005, 1002p.

LIMA, D. A.; LUNA, R. L. N.; ROCHA, J. M. T. S.; SILVA, P. M. P.; GOUVEIA, E. R. Efeito de diferentes formas de preparo do inóculo e de concentrações dos nutrientes na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. In: **I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO, 2013**, Recife. Anais I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO | 2013, 2013. v. 1.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n.68, p. 223-253, 2010.

MAGRÍ, A. D.; MAGRÍ, A. L.; BALESTRIERI, F.; SACCHINI, A.; MARINI, D. Spectrophotometric micro-method for the determination of ethanol in commercial beverages. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 357, n.7, p. 895-988. 1997.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A.; RODRIGUES, J. R. A. Breve Descrição do Proálcool e perspectiva futuras para o etanol produzido no Brasil. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociedade Rural. Rio Branco, 2008.

MILLANEZ, A.Y.; FILHO, P. S. C. F.; ROSA, S. C. S. Perspectiva para o etanol brasileiro. **BNDES Setorial**, nN.27, p. 21-28, 2008.

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

MISCHAN, M. M.; TORERS, L. M.; LEONEL, M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Revista Ciência Rural**, v.42, n.7, p. 1327-1332, 2012.

NEVES, V. J. M. **Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, Brasil, 2004.

OLIVEIRA, L.M.; SERRA, J.C.V.; OLIVEIRA, K. B. M. Balanço Energético da Produção de etanol para diferentes matérias primas. **Revista Eletrônica do curso de Geografia**, n.22, p.39-52, 2014.

OLIVEIRA, V. N.; AQUINO, A. F.; BIDÔ, E. S.; GALVÃO, M. L. M. O etanol da cana de açúcar: Possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim – RN. **Revista HOLOS**, ano.30, v.01, p. 105-125, 2014.

OLIVEIRA, A. S. **COP-21 em pauta A INDC Brasileira. Departamento de mudanças climáticas**. Ministério do meio ambiente. Fapesp, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V., FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

ORTIZ, S. **Produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) , Universidade Regional de Blumenau. Blumenau-SC, Brasil, 2010.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre em escoamento ascendente** . 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil, 2010.

PEREIRA JUNIOR, G. P.; PEREIRA, E. M. O.; FILHO, M. P.; BARBOSA, P. S.; SHIMODA, E.; BRANDÃO, L.V. Desempenho produtivo de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomun* CUVIER, 1818) alimentados com rações contendo farinha de crueira de mandioca (*Maninhot esculenta* Crantz) em substituição ao milho (*Zea mays*). **ACTA Amazonica**,v..43, n.2, p.217-226, 2013.

PESSANHA, F. S.; A. FILHO, J. C. Otimização dos métodos tradicionais e busca de novas alternativas de obtenção de etanol visando a sua viabilidade. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v.02, n.01, p.245-251, 2012.

PREGNOLATTO, W.; PASCUET, N. S. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3º. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p.1020, 1985.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. 2002.184 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimento), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil, 2002.

SANTANA. N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzima e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG, Brasil, 2007.

SALLET,C.L.; ALVIM, A.M. Biocombustíveis: uma análise da evolução do biodiesel no Brasil. **Revista Economia e Tecnologia**. Ano.7, v.25, p. 01-13, 2011.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 2012. 157f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, Brasil, 2012.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. 218f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) , Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de açúcar para a produção de etanol. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 05, p. 1004-1010, 2012.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ, Brasil, 2010.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas**. 2011.82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) , Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS,Brasil, 2011.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) , Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, Brasil, 2005.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Cap.- 15. Hidrólise do amido. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1º ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v. 3, 379-448p.

TAMBOURGUI, E. B.; CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 03, p. 613-617, 2010.

TAPARELLI, J.R. **Modificação química do amido de mandioca e estudos da sua aplicação em revestimentos couché**. 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, Brasil, 2005.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v.42 . n.7. p. 1327- 1332, 2012.

UNICA. União da Agroindústria Canavieira. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil: Respostas às questões mais frequentes**. São Paulo. Março, 2007.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Cord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, cap. 19, 2003, 530-575p,.

VIEIRA, M. C. A.; LIMA, J. F.; BRAGA, N. M. Setor sucroalcooleiro brasileiro: evolução e perspectivas. Sucroalcooleiro. **BNDES e DEAGRO**, p. 209-245, 2007.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TISANG, A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n.1, p.146-148, 2006.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4^o.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v. 01, p. 1020, 2005.