

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Engenharia Química

KALLYANA MORAES CARVALHO DOMINICES

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas Lam.* (L))

CAMPINAS 2017

KALLYANA MORAES CARVALHO DOMINICES

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas Lam.* (L))

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Rubens Maciel Filho *Co-orientadora:* Laura Plazas Tovar

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA PELA ALUNA KALLYANA MORAES CARVALHO DOMINICES E ORIENTADA PELO PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO

> CAMPINAS 2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2008/57873-8; CAPES

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Dominices, Kallyana Moraes Carvalho, 1986-

D713d Desenvolvimento e otimização da produção de etanol de primeira e segunda geração a partir da batata-doce (Ipomoea batatas Lam. (L)) / Kallyana Moraes Carvalho Dominices. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rubens Maciel Filho.

Coorientador: Laura Plazas Tovar. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Batata-doce. 2. Hidrólise ácida. 3. Hidrólise enzimática. 4. Otimização. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Tovar, Laura Plazas. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and optimization of the production of first and second generation ethanol from sweet potato (Ipomoea batatas Lam. (L)) Palavras-chave em inglês: Sweet potato Acid hydrolysis Enzymatic hydrolysis Optimization Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Titulação: Doutora em Engenharia Química Banca examinadora: Rubens Maciel Filho [Orientador] Adriano Pinto Mariano Leonardo Vasconcelos Fregolente Melina Savioli Lopes Betânia Hoss Lunelli Data de defesa: 25-09-2017 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de Doutorado defendida por Kallyana Moraes Carvalho Dominices e aprovada em 25 de setembro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador

Dr. Adriano Pinto Mariano

Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente

Dra. Melina Savioli Lopes

Dra. Betânia Hoss Lunelli

Informo que a Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se disponível no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, Manoel e Maria Raimunda, as minhas irmãs, Viviane e Fabíola e ao meu querido esposo Dominices Filho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que é a razão de viver. Quis encontrar palavras perfeitas para agradecê-Lo por esta conquista. Contudo, não são palavras ou frases feitas que conseguirão expressar o que sinto e quão grata estou por este dia. Obrigada por tudo Senhor!

Aos meus pais, Manoel e Maria Raimunda, que não foram apenas meus pais, foram amigos e companheiros, até mesmo quando meus ideais pareciam distantes e inatingíveis, e o estudo uma batalha difícil. Aconselharam, encorajaram para que fosse forte e persistente. E hoje, juntos neste ideal, vencemos! Divido, agora, os méritos desta conquista, porque ela também lhes pertence. Vocês merecem tanto quanto eu. Amo vocês!

As minhas irmãs, Viviane e Fabíola, pelo carinho, amizade e incentivo em todos os momentos desta conquista. Aos cunhados Afonso Filho e Luiz Carlos pela amizade, ensinamentos, ajuda. Aos sobrinhos Emanuel, Samuel e Davi Luiz pelo amor de sempre.

Ao meu esposo Dominices Filho, pelo amor, carinho, pois existem pessoas que marcam para sempre nossas vidas, por isso, estou honrada em compartilhar com você este momento tão importante. Desculpe se o privei de momentos importantes juntos, mas havia a necessidade e a importância do estudo para minha vida. Agora, mesmo com os desafios à frente, estou certa de que irei resgatar tudo o que nos une. Receba meu sincero agradecimento pelo carinho, amor e compreensão, que foi o alicerce necessário para construir o futuro que tanto almejei.

Aos amigos de Campinas Vinícius, Michelle, Jaiver, Sergio, Astrid, Emília, fico grata pela amizade, pelo carinho e pelo apoio. Serei eternamente grata pelo que fizeram por mim.

Aos amigos de Palmas Diego, Gabriela, fico grata pela amizade e acima de tudo pelos momentos marcantes que compartilhamos juntos, quantos sorrisos, quantas lágrimas... Lembro-me dos dias árduos no laboratório, dos testes, das hidrólises, fermentações, tantos momentos marcantes. Aos queridos Wesley, Douglas, Marysa pela ajuda indispensável, pelo companheirismo e boas horas de risada que pudemos compartilhar. Aos colegas do IFTO Rejane, Rogério, Cristiane, Augusto, Alysson pelo apoio de sempre.

Aos amigos do coração Rejane, Ítalo e Gabriel pela amizade, companheirismo e apoio incondicional.

Aos professores da UFT por todo conhecimento transmitido durante o tempo em que convivemos, em especial ao querido Professor Tarso que nunca mediu esforços para contribuir com a pesquisa.

Aos professores da Unicamp, Martin, Maria Regina e em especial ao meu querido orientador Professor Rubens que foi capaz de me mostrar que um excelente profissional precisa, além do conhecimento, ter bom caráter, muita responsabilidade e acima de tudo, muito amor.

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para o meu crescimento, aprendizado e sucesso.

A partir de agora me sinto mais completa, mais inteira. As lutas, horas debruçadas sobre os livros, as ansiedades antes e depois de cada experimento, hoje são lembranças agradáveis e ainda presentes na memória. Dentro em breve estarei com um título nas mãos, renovando ideais, concretizando sonhos, que os anos na universidade amadureceram. No momento da defesa, coração batendo mais forte, talvez a emoção me domine e não sinta a magia do momento sublime do qual me aproxima, mas ao recordar, tudo será revivido como se estivesse novamente acontecendo, e irei me sentir mais completa, mais inteira, como hoje!

RESUMO

A busca por fontes limpas e renováveis de energia tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias alternativas aos processos convencionais, tais como o uso dos biocombustíveis. Uma alternativa para a produção de etanol de primeira e segunda geração é o uso de fontes amiláceas e materiais lignocelulósicos como fontes de carbono barato, renovável e sustentável. Levando-se estes pontos em consideração, a batata-doce (Ipomoea batatas) tem sido considerada um substrato promissor para fermentação alcoólica, uma vez que apresenta elevados teores de amido, na faixa de 32 a 70%. As batatas-doces industriais desenvolvidas para a produção de bioenergia são selecionadas por seu maior teor de amido e melhores rendimentos de etanol, como o caso da cultivar 'Duda'. Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar, avaliar e otimizar a produção de etanol de primeira e segunda geração quando proveniente da raiz e das ramas da batata-doce, respectivamente. Para a obtenção de etanol de segunda geração foi realizado um estudo da hidrólise ácida das ramas da batata-doce, com variações nas cargas de sólido [10, 20 e 30% (m/m)], nas concentrações de ácido sulfúrico [1, 2 e 3% (m/v)], nos tempos (15, 30, 60 e 90 minutos) fixando a temperatura em 121°C. Após o estudo realizou-se a otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta, obtendo como ponto ótimo as seguintes condições: carga de sólido: 22 % (m/m); concentração de ácido sulfúrico: 2,5% (m/v); tempo: 30 minutos na temperatura de 121°C. Para o estudo da produção de etanol de primeira geração utilizando as raízes da batata-doce, foi realizado um planejamento experimental visando a otimização da duas etapas da hidrólise enzimática, liquefação e sacarificação, avaliando carga de sólidos, dose de enzimas, temperatura e tempo. O ponto considerado ótimo para a etapa de liquefação foi carga de sólido: 15% (m/m), dose de α-amilase: 0,76% (v/v), temperatura: 79 °C e tempo: 89 minutos. A partir deste foi realizado a otimização da etapa de sacarificação, definida pela condição: Dose de amiloglucosidase: 0,50% (v/v), temperatura: 50°C e tempo: 40 minutos. Nestas condições, obteve-se concentrações de 172,22 g/L de glicose, 21,04 g/L de sacarose, 53,59 g/L de frutose e 9,05 g/L de celobiose. Assim, foi possível observar a viabilidade da utilização da batata-doce para a produção de etanol de primeira e segunda geração, o que possibilitaria o incremento da produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis e sustentáveis.

Palavras-chave: batata-doce, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, otimização.

ABSTRACT

The demand for clean and renewable sources has stimulated the development of new technologies as alternative to the conventional processes, such as the biofuels production. The use of amylaceous sources and lignocellulosic materials appears as a promising alternative for the production of first (1G) and second (2G) generation ethanol due to their low cost and renewable and sustainable characteristics. In this context, the sweet potato (Ipomoea batatas) has been considered a potential substrate for the alcoholic fermentation since it presents high levels of starch, from 32 to 70%. Industrial sweet potatoes developed for the production of bioenergy are selected due to their higher level of starch and better yield of ethanol, such as the cultivar "Duda". Therefore, the aim of this work was to investigate, evaluate and optimize the production of 1G and 2G ethanol from root and branches of sweet potato, respectively. In order to obtain the 2G ethanol the acid hydrolysis of sweet potato branches was carried out varving the load of solids [10, 20 and 30% (w/w)]. sulfuric acid concentration [1.0, 2.0 and 3.0% (w/v)] and time (15, 30, 60 and 90 min) at 121°C. Then, the experimental data were statistically investigated obtaining the optimized conditions of 22% (w/w) loading of solids, 2.5% (w/v) of sulfuric acid concentration and time of 30 min. For the production of 1G ethanol from sweet potato roots an experimental design was performed in order to obtain the optimization of two steps of enzymatic hydrolysis, liquefaction and saccharification, evaluating the load of solids, dose of enzymes, temperature and time. The optimized conditions for the liquefaction step were the following: 15% (w/w) load of solids, 0.76% (v/v) dose of α amylase, temperature of 79°C and time of 89 min. The optimization of the saccharification step was found in the condition of 0.50% (v/v) dose of amyloglucosidase, 50°C and 40 min. Under these conditions, sugar concentrations of 172.22 g.L⁻¹ glucose, 21.04 g.L⁻¹ sucrose, 53.59 g.L⁻¹ fructose and 9.05 g.L⁻¹ cellobiose were obtained. Thus, these results showed the potential of sweet potato as raw material for the production of first and second generation ethanol and its use would increase the biofuel production from renewable and sustainable sources.

Keywords: sweet potato, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas de obtenção de etanol	33
Figura 2 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica	43
Figura 3 – Subunidade (glicose) e fórmula estrutural da celulose	44
Figura 4 – Arranjo de pentoses formando a estrutura molecular	da
hemicelulose	45
Figura 5 – Estrutura molecular de uma subunidade da lignina	.46
Figura 6 – Fluxograma simplificado da hidrólise ácida das ramas da batata-doce	sob
diferentes condições de operação	63
Figura 7– Ramas de batata-doce	64
Figura 8 – Ramas de batata-doce prontas para secagem	.66
Figura 9 – Ramas de batata-doce secas e armazenadas em sa	icos
herméticos	66
Figura 10 – Esquema da Hidrólise Ácida das Ramas	75
Figura 11 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	10
%(m/m)	77
Figura 12 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	20
%(m/m)	80
Figura 13 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	30
%(m/m)	80
Figura 14 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	10
%(m/m)	82
Figura 15 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	20
%(m/m)	82
Figura 16 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	30
%(m/m)	83
Figura 17 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	10
%(m/m)	84
Figura 18 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	20
%(m/m)	85
Figura 19 - Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de	30
%(m/m)	85

Figura 20 - Concentrações observadas de celobiose na hidrólise ácida das ramas da batata-doce......90 Figura 21 - Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de celobiose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce...........92 Figura 22 - Concentrações observadas de glicose na hidrólise ácida das ramas da Figura 23 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de glicose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce......95 Figura 24 - Concentrações observadas de xilose na hidrólise ácida das ramas da Figura 25 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na Figura 26 – Concentrações observadas de arabinose na hidrólise ácida das ramas Figura 27 - Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de arabinose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce......101 Figura 28 – Concentrações observadas de furfural na hidrólise ácida das ramas da Figura 29 - Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de furfural no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce......104 Figura 30 - Concentrações observadas de 5-hidroximetilfurfural na hidrólise ácida das ramas da batata-doce......106 Figura 31 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de 5-hidroximetilfurfural no hidrolisado ácido das ramas da batata-Figura 32 – Raízes de batata-doce......112 Figura 33 – Farinha de batata-doce.....113 Figura 34 – Fluxograma da Hidrólise Enzimática das Raízes da Batata-doce......126 Figura 35 – Efeito da carga de sólidos e da dose de α-amilase na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce..... Figura 36 – Efeito da carga de sólidos e da temperatura na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce..... **Figura 45 –** Efeito da carga de sólido e da dose de α-amilase na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

Figura 50 – Efeito da carga de sólidos e da dose de α-amilase na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-Figura 51 – Efeito da carga de sólidos e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-Figura 52 – Efeito da carga de sólidos e do tempo na concentração de celobiose na liquefação na hidrólise enzimática etapa das raízes batatade da Figura 53 – Efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-**Figura 54 –** Efeito da dose de α-amilase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-Figura 55 - Efeito da temperatura e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce......158 Figura 56 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce......161 Figura 57 – Efeito da temperatura e do tempo na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce......162 Figura 58 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de sacarose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-Figura 59 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de frutose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-Figura 60 - Efeito da dose de amiloglucosidase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Referências de estudos encontrados na literatura sobre a produção deetanol a partir das raízes da batata-doce
Tabela 21 – Principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos nos
materiais lignocelulósicos
Tabela 2.2 – Referências de estudos encontrados na literatura de diversas formas
de pré-tratamento
Tabela 3 – Resultado da caracterização das ramas de batata-doce
Tabela 3.1 – Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose),
produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido acético) na hidrólise
ácida das ramas com cargas de sólido (10, 20 e 30 %m/m), tempo reacional (15, 30,
60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e concentração 1 %(m/v) de ácido
sulfúrico
Tabela 3.2 – Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose),
produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido acético) na hidrólise
ácida das ramas com cargas de sólido (10, 20 e 30 %m/m), tempo reacional (15, 30,
60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e concentração 2 %(m/v) de ácido
sulfúrico
Tabela 3.3 – Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose),
produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido acético) na hidrólise
ácida das ramas com cargas de sólido (10, 20 e 30 %m/m), tempo reacional (15, 30,
60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e concentração 3 %(m/v) de ácido
sulfúrico
Tabela 4 – Variáveis do planejamento composto central na temperatura de 121 °C e
tempo reacional de 30 minutos
Tabela 4.1 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
celobiose na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce
Tabela 4.2 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
celobiose

Tabela 4.3 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a glicose Tabela 4.4 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a Tabela 4.5 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a xilose Tabela 4.6 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a Tabela 4.7 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a Tabela 4.8 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a arabinose......100 Tabela 4.9 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o furfural na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce......102 Tabela 4.10 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para o Tabela 4.11 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o 5hidroximetlfurfural na otimização da hidrólise ácida das ramas da batatadoce......105 **Tabela 4.12 –** Teste de significância para cada coeficiente de regressão para o 5-**Tabela 5 –** Projeção da produção de etanol de batata-doce, cana-de-açúcar e milho em função da área cultivada no Estado do Tocantins, na safra 2017/18......111 Tabela 5.1 - Médias dos constituintes químicos da raiz da batata-doce cultivar Variáveis Tabela 5.3 _ do planejamento composto central da Liquefação......127 Tabela 5.4 _ Variáveis do planejamento composto da central Sacarificação.....128 Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a glicose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce......130

Tabela 5.6 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de glicose130
Tabela 5.7 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
sacarose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da
batata-doce138
Tabela 5.8 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de sacarose138
Tabela 5.9 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a frutose
na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-
doce144
Tabela 5.10 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de frutose144
Tabela 5.11 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
celobiose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes
da batata-doce151
Tabela 5.12 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de celobiose151
Tabela 5.13 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
glicose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes
da batata-doce159
Tabela 5.14 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de glicose160
Tabela 5.15 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
sacarose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes
da batata-doce163
Tabela 5.16 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de sacarose163
Tabela 5.17 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a
frutose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes
da batata-doce165
Tabela 5.18 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a
concentração de frutose165

Tabela 5.19 - Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão pa	ra a
celobiose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das ra	aízes
da batata-doce	.168
Tabela 5.20 - Teste de significância para cada coeficiente de regressão pa	ira a
concentração de celobiose	.168

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Pesquisas realizadas na China utilizando a batata-doce com	no substrato
para a produção de etanol	39
Quadro 2 – Definição das conversões dos açúcares (Chen et al., 2012)	78

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	24
INTRODUÇÃO	24
1.1 – Objetivo Geral	27
1.2 – Objetivos Específicos	27
1.3 – Organização do Trabalho	28
1.4 – Principais Contribuições	29
CAPÍTULO 2	30
REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1 – Biocombustíveis	
2.2 – Etanol de fontes indiretamente fermentescíveis	33
2.2.1 – Etanol de fontes amiláceas	33
2.2.1.1 – Amido	35
2.2.1.2 – Batata-doce	36
2.2.2 – Etanol Lignocelulósico	42
2.2.2.1 – Materiais Lignocelulósicos	43
2.2.2.1.1 – Celulose	44
2.2.2.1.2 – Hemicelulose	45
2.2.2.1.3 – Lignina	46
2.2.2.2 – Pré-tratamentos	46
2.2.2.1 – Pré-tratamentos Físicos	48
2.2.2.1.1 – Moagem	48
2.2.2.2.2 – Pré-tratamentos Químicos	49
2.2.2.2.1 – Alcalino	49
2.2.2.2.2 – Ácido diluído	49
2.2.2.2.3 – Oxidação úmida	50
2.2.2.2.4 – Organosolv	50
2.2.2.2.5 – Líquido iônico	51
2.2.2.3 – Pré-tratamentos físico-químicos	51
2.2.2.3.1 – Explosão de vapor	51
2.2.2.3.2 – Hidrotérmico	52
2.2.2.3.3 – Explosão de fibra com amônia (AFEX) e Explosão com CO ₂	53
2.2.2.3.4 – Ozonólise	53

2.2.2.2.4 – Pré-tratamento Biológico	54
2.2.3 – Hidrólises	59
2.2.3.1 – Hidrólise dos Materiais Amiláceos	59
2.2.3.2 – Hidrólise dos Materiais Lignocelulósicos	61
2.3 – Conclusões	62
CAPÍTULO 3	63
INVESTIGAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS RAMAS DA BATATA-DOCE	63
3.1 – Caracterização química das ramas da batata-doce	63
3.1.1 – Introdução	63
3.1.2 – Materiais e Métodos	64
3.1.2.1 – Matéria-prima	64
3.1.2.2 – Preparo da Matéria-prima e determinação do teor de umidade	65
3.1.3 – Determinações analíticas	67
3.1.3.1 – Determinação de cinzas	67
3.1.3.2 – Determinação dos extrativos	67
3.1.3.3 – Determinação dos carboidratos estruturais, grupos acetil, furfural, 5 hidroximetilfurfural e lignina	- 68
3.1.3.4 – Lignina Insolúvel	69
3.1.3.5 – Lignina Solúvel	69
3.1.3.6 – Quantificação de carboidratos	70
3.1.3.7 – Quantificação de grupos acetila e produtos de degradação	71
3.1.4 – Resultados e Discussões	73
3.2 – Hidrólise Ácida das Ramas de Batata-doce	74
3.2.1 – Separação do hidrolisado	76
3.2.2 – Resultados e Discussões	76
3.2.2.1 – Efeito da concentração de 1 %(m/v) de ácido sulfúrico	76
3.2.2.2 – Efeito da concentração de 2 %(m/v) de ácido sulfúrico	80
3.2.2.3 – Efeito da concentração de 3 %(m/v) de ácido sulfúrico	83
3.3 – Conclusões	86
CAPÍTULO 4	87
MAPEAMENTO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS RAMA DA BATATA-DOCE UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE	S
RESPOSTA	87
4.1 – Introdução	87
4.2 – Metodologia de Superfície de Resposta	88

4.3 – Resultados e Discussões	88
4.3.1 – Celobiose	89
4.3.2 – Glicose	92
4.3.3 – Xilose	95
4.3.4 – Arabinose	98
4.3.5 – Furfural	102
4.3.6 – 5-Hidroximetilfurfural	105
4.4 – Conclusões	108
CAPÍTULO 5	109
OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RAIZ DA BATATA-DOCE	109
5.1 – Introdução	109
5.2 – A batata-doce como alternativa para a produção de etanol	109
5.3 – Cultivar 'Duda'	110
5.4 – Caracterização química das raízes	111
5.4.1 – Matéria-prima	111
5.4.2 – Preparo da Matéria-prima e Determinação do Teor de Umidade	111
5.4.2.1 – Determinação do teor de amido na farinha da batata-doce	113
5.4.2.1.1 – Método de Lane-Eynon (também conhecido como Método de Fehling)	114
5.4.2.1.1.1 – Princípio	114
5.4.2.1.1.2 – Padronização do Reagente de Fehling	114
5.4.2.1.1.3 – Cálculo do Título da Solução Fehling	115
5.4.2.1.2 – Método de Determinação de Açúcares Redutores (Em Glicos	e)115
5.4.2.1.2.1 – Procedimento	115
5.4.2.1.2.2 – Cálculo dos Glicídios Redutores em Glicose	116
5.4.2.1.3 – Método de Determinação de Açúcares Totais	116
5.4.2.1.3.1 – Procedimento	116
5.4.2.1.3.2 – Cálculo dos Glicídios Totais	117
5.4.2.1.3.3 – Cálculo dos Glicídios Não Redutores	117
5.4.2.1.4 – Método de Determinação de Amido	118
5.4.2.1.4.1 – Princípio	118
5.4.2.1.4.2 – Procedimento	118
5.4.2.1.4.3 – Cálculo do Teor de Amido	
5.4.2.2 – Determinação do Teor de Cinzas	119

5.4.2.2.1 – Procedimento	119
5.4.2.2.2 – Cálculo	119
5.4.2.3 – Determinação do Teor de Lipídeos	119
5.4.2.3.1 – Procedimento	119
5.4.2.3.2 – Cálculo	120
5.4.2.4 – Determinação do Teor de Proteínas	120
5.4.2.4.1 – Procedimento	120
5.4.2.4.2 – Cálculo	120
5.4.2.5 – Determinação do Teor de Fibra Bruta	121
5.4.2.5.1 – Procedimento	121
5.4.2.5.2 – Cálculo	121
5.4.3 – Resultados e Discussão	121
5.5 – Hidrólise Enzimática	122
5.5.1 – Termamyl®	123
5.5.2 – AMG 300L	124
5.6 – Estudo Enzimático	124
5.6.1 – Liquefação	126
5.6.2 – Sacarificação	127
5.6.3 – Quantificação de carboidratos	128
5.6.4 – Resultados e Discussões	129
5.6.4.1 – Otimização da Liquefação	129
5.6.4.1.1 – Glicose	129
5.6.4.1.2 – Sacarose	137
5.6.4.1.3 – Frutose	143
5.6.4.1.4 – Celobiose	150
5.6.4.2 – Otimização da Sacarificação	159
5.6.4.2.1 – Ponto Ótimo	159
5.6.4.2.2 – Glicose	159
5.6.4.2.3 – Sacarose	162
5.6.4.2.4 – Frutose	165
5.6.4.2.5 – Celobiose	167
5.7 – Conclusões	170
CAPÍTULO 6	171
CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	171

6.1 – Conclusão Geral	171
6.2 – Sugestões para Trabalhos Futuros	172
CAPÍTULO 7	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A busca por fontes limpas e renováveis de energia tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias alternativas, tais como a energia solar, a energia eólica, a energia geotérmica, biocombustíveis entre outros, aos processos convencionais, como os derivados do petróleo, carvão mineral e gás natural (Fujita et al., 2016). Os biocombustíveis têm demonstrado um grande potencial para a substituição em maior escala dos derivados de petróleo apresentando diversas vantagens como a redução da emissão de gases do efeito estufa (Vargas et al., 2015; Ma et al., 2015). Nas últimas décadas, o consumo de combustíveis fósseis levou um aumento da procura de fontes alternativas de combustíveis (Ferreira et al., 2009) em especial os líquidos para transporte com uso em carros (etanol substituindo a gasolina) e veículos pesados que fazem uso do ciclo diesel (biodiesel em substituição ao diesel).

Existem diversas fontes disponíveis para a produção destes tipos de biocombustíveis, como por exemplo, cana-de-açúcar, beterraba, milho, oleaginosas como a soja, mamona, dendê, pinhão-manso, além da biomassa vegetal que gera a celulose, as hemiceluloses e a lignina que se apresentam como fontes interessantes para a geração desses biocombustíveis. Como estas matérias-primas são de fontes vegetais com culturas agrícolas dominadas, pode-se garantir a continuidade da produção e com isto evitar uma eventual crise de abastecimento energético (Santana, 2007; Silva, 2010; Yang et al., 2013; Li et al., 2016).

Segundo Ferrari et al. (2005) e Santana (2007), uma alternativa para a produção de etanol de primeira geração seria a partir de fontes amiláceas, que se destacam como excelente opção para a fermentação alcoólica por apresentar alto teor de amido, como por exemplo o uso da batata-doce, mandioca, milho, arroz entre outros, pois acenam como alternativa na geração de receita para a indústria baseada em fontes renováveis. Além disso, vem apresentando um potencial promissor, sendo um mercado que cresce devido à contribuição ao meio ambiente, com redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental e como fontes de energia renovável (Jeong et al., 2016).

Levando-se estes pontos em consideração, a batata-doce (*Ipomoea batatas*) tem sido considerada um promissor substrato para fermentação alcoólica, uma vez que apresenta elevados teores de amido, na faixa de 32 a 70% como as pesquisas apresentadas por Ziska et al. (2009) com 50% de amido; Zhang et al. (2011) que obteve 23,91% de amido, Silveira et al. (2011) com 47,62% de amido; Srichuwong et al. (2012) apresentou resultados na faixa de 68,7 a 70,1% de amido. A batata-doce apresenta açúcares fermentescíveis simples, tais como glicose, frutose e sacarose variando de 15,89 a 36,04%, como demonstrado por Jin et al. (2012) em suas pesquisas e Zhang et al. (2011) que encontrou 9,32% de açúcares fermentescíveis, sendo que 7,76% era glicose.

A batata-doce tem várias características agronômicas que determinam a sua ampla adaptação às terras marginais, como solos secos e menos férteis, alta taxa de multiplicação, baixa degeneração do material de propagação, ciclo curto, baixa incidência de doenças e pragas, rápida cobertura de solo e, por conseguinte, protege das chuvas erosivas (Cao et al., 2011).

As batatas-doces industriais desenvolvidas para a produção de bioenergia são selecionadas por seu maior teor de amido e melhores rendimentos de etanol, como o caso dos resultados obtidos por Silveira (2008), que obteve para a cultivar 'Duda', 24,4% de amido e 161,04 litros de etanol por tonelada de raiz. A produção nacional atingiu em 2013 índices de 505.350 toneladas de raiz em 39.393 hectares de área plantada, com rendimento médio de aproximadamente 13 toneladas por hectare. Vale ressaltar, que as cultivares desenvolvidas para a produção de etanol não são destinadas como culturas alimentares (Duvernay et al., 2013), pois sua aparência, cor e sabor não são atraentes para o uso como alimento.

Neste contexto uma equipe de pesquisadores da Universidade Federal do Tocantins – Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis – LASPER/UFT, iniciou um estudo em 1997 visando desenvolver cultivares de batata-doce com características específicas para a produção de etanol. Após dez anos de ajustes e definição de processos e bioprocessos desenvolvidos em parceria com uma empresa de etanol de Sertãozinho/SP, chegou-se a um sistema capaz de ser implantado com sucesso, lançando dez novas cultivares voltadas especificamente para a produção de etanol, adaptadas as condições edafoclimáticas¹ do Tocantins, assim como permitindo a integração econômica, social e a sustentabilidade ambiental.

Assim como as fontes amiláceas, os materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol de segunda geração, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo (Martín et al., 2007). A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas tem sido considerada próspera, visto que a demanda por energias limpas vem aumentando com o conceito de preservação do meio ambiente e redução dos gases de efeito estufa (Akimkulova et al., 2016), sendo que dentre estas fontes podem se destacar os resíduos agroindustriais como a casca e palha de arroz, palha de cevada, palha de trigo, palha e forragem e milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar e as ramas da batata-doce. Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um processo de produção de etanol de segunda geração a partir das ramas da batata-doce por meio de um pré-tratamento com ácido sulfúrico visando um processo sustentável de produção de etanol.

A consolidação do etanol como combustível do futuro deve passar pelo desafio de aumentar ainda mais a produtividade deste, sem aumentar o seu custo e de forma que suas culturas não avancem sobre outras culturas agrícolas. Neste sentido a utilização da biomassa lignocelulósica vem sendo amplamente estudada para a produção do etanol chamado de segunda geração, ou Bioetanol como é também conhecido, devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e à grande quantidade de açúcares fermentescíveis, embora não prontamente disponíveis (Miyafuji et al., 2003).

Contudo, as matérias-primas com altos conteúdos de carboidratos, devem ter eficiência e a otimização nos processos de transformação destes carboidratos (Ferrari et al, 2013), com isso a presente pesquisa tem como outro objetivo otimizar o processo implantado na Universidade Federal do Tocantins de produção de etanol de primeira geração a partir das raízes da batata-doce a fim de disponibilizar maiores teores de açúcares fermentescíveis, e consequente aumentar o rendimento de etanol. Considera-se importante salientar que nas instalações da planta piloto da Universidade Federal do Tocantins utiliza-se apenas o hidrolisado enzimático, porém este trabalho tem como objetivo, além da otimização da hidrólise enzimática, a

¹ Condições edafoclimáticas: são características relativas à influência de fatores do meio como: clima, relevo, temperatura, umidade do ar, tipo de solo, precipitação pluvial entre outros.

investigação do potencial fermentativo do hidrolisado ácido obtido a partir das raízes da batata-doce com o intuito de reduzir custos do processo com enzimas.

Este trabalho também contempla o desenvolvimento do processo de produção de etanol de segunda geração a partir das ramas da batata-doce por meio de um pré-tratamento com ácido sulfúrico visando um processo sustentável de produção de etanol. As biomassas lignocelulósicas utilizadas na biorefinaria necessitam da etapa do pré-tratamento a fim de facilitar a hidrólise enzimática da celulose e sua posterior fermentação (Cavalaglio et al., 2016).

Com os desenvolvimentos descritos acima e apesentados nas sessões posteriores, as principais contribuições são descritas a seguir.

1.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar, avaliar e otimizar a produção de etanol de primeira e segunda geração quando proveniente da raiz e das ramas, respectivamente, da batata-doce (cultivar 'Duda', colheita realizada após 180 dias de plantio).

1.2 – Objetivos Específicos

Os objetivos específicos vinculados ao desenvolvimento desta pesquisa são:

 Realizar uma avaliação técnica da conversão das ramas da batatadoce através da hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico sob as seguintes condições operacionais: Carga de sólidos (10, 20 e 30%m/m), Concentração de ácido (1, 2 e 3% m/v), Tempo reacional (15, 30, 60 e 90 min) com uma temperatura de 121°C.

ii. Procurar condições de operação que permitam otimizar o processo do pré-tratamento com ácido sulfúrico das ramas da batata-doce para a produção de açúcares fermentescíveis na linha de processo de etanol utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os efeitos estatísticos das variáveis operacionais (concentração de ácido e carga de sólidos) sob as variáveis dependentes (rendimento mássico de açúcares e inibidores, seletividade de inibidores e eficiência do pré-tratamento) foram estudados. iii. Investigar e analisar as variáveis de processo da hidrólise enzimática da raiz da batata-doce, executada sob uma combinação enzimática de amilase (0,12 KNU/g de amido) e amiloglucosidade (1,6 AGU/g de amido) quando considerado um tempo reacional entre 0 e 24 h e variações na carga de sólidos (ou substrato enzimático), tempo e temperatura.

iv. Identificar as condições de operação para otimizar o processo de hidrólise enzimática da raiz da batata-doce, desenvolvido em duas etapas, a saber: a liquefação e a sacarificação, para a produção de açúcares fermentescíveis na linha de processo de etanol utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os efeitos estatísticos das variáveis operacionais (temperatura, tempo, carga enzimática e carga de sólidos) sob as variáveis dependentes (rendimento mássico de açúcares e eficiência da hidrólise) foram estudados.

v. Estabelecer cenário(s) que integre(m) a produção de etanol de segunda geração (a partir dos açúcares fermentescíveis produzidos por meio das ramas da batata doce) e a hidrólise ácida e/ou enzimática da raiz da batata-doce, visando um processo sustentável de produção de etanol.

1.3 – Organização do Trabalho

Esta tese de doutorado foi dividida em capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

O Capítulo 2, "Revisão da Literatura" apresenta os principais conceitos dos materiais amiláceos e lignocelulósicos. Contém ainda a descrição dos prétratamentos mais utilizados nos materiais lignocelulósicos e as hidrólises ácida e enzimática utilizadas nos materiais amiláceos.

O Capítulo 3, "Investigação da Hidrólise Ácida das Ramas da Batatadoce" detalha a caracterização química das ramas, além da metodologia utilizada na hidrólise ácida desta biomassa. Os resultados da caracterização juntamente com os resultados dos efeitos das variáveis estudadas (carga de sólido, concentração da solução de ácido sulfúrico e tempo) são apresentados neste capítulo.

O Capítulo 4, "Mapeamento das Condições Ótimas da Hidrólise Ácida das Ramas da Batata-doce utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta" mostra os resultados do planejamento estatístico composto central visando o mapeamento das condições de operação para otimizar as hidrólises ácidas propostas. O Capítulo 5, "Otimização da Hidrólise Enzimática das Raízes da Batatadoce" apresenta o potencial das raízes de batata-doce para obtenção de etanol, por meio da caracterização química. Foi demonstrada a metodologia usada na caracterização das raízes e seus resultados. O estudo enzimático foi detalhado, procurando obter as melhores condições de operação para as duas etapas da hidrólise enzimática – liquefação e sacarificação, utilizando a metodologia de superfície de resposta.

O Capítulo 6, "Conclusão Geral e Sugestões para Trabalhos Futuros" apresenta o resumo dos principais resultados obtidos no trabalho, além de elencar as sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

1.4 – Principais Contribuições

A investigação, mapeamento e avaliação do processo de produção de etanol de primeira e segunda geração proveniente da raiz e das ramas da batatadoce, respectivamente, trouxeram conhecimentos e informações úteis para a definição das possíveis rotas no campo dos biocombustíveis. O mapeamento e a identificação das faixas ótimas de operação são importantes projeções para à consolidação de uma tecnologia para o processamento da batata-doce para a produção de etanol de primeira e segunda geração.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Biocombustíveis

Os biocombustíveis estão no centro de uma intensa controvérsia internacional que envolve governos, organismos internacionais, comunidades científicas e ambientalistas – além de poder afetar os interesses econômicos ligados à indústria petrolífera e automobilística. O Brasil é um dos principais protagonistas desse debate, credenciado pelo seu pioneirismo no desenvolvimento do álcool combustível e do biodiesel. A vertiginosa escalada do preço do petróleo no mercado internacional nos últimos anos e as relativamente constantes oscilações no preço, que provoca pressões inflacionárias e alterações nos preços de várias *comodities*, torna ainda mais urgente a busca de alternativas para reduzir a dependência de combustíveis fósseis (IEL/NC, 2008).

Os biocombustíveis implicam em razões de segurança energética, preocupações ambientais e a questão socioeconômica relacionada ao setor rural (Demirbas, 2007) e apresentam vantagens como: ser facilmente obtidos a partir de fontes abundantes e baratas e seu uso permite reduzir a emissão de carbono para a atmosfera, sendo ainda biodegradáveis e contribuindo para a sustentabilidade (Puppan, 2002; Hahn-Hägerdal et al., 2006).

A substituição gradual do petróleo por fontes de energia alternativas oriundas de biomassas renováveis é vista como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz quanto aos problemas ambientais (Ragauskas et al., 2006). Nota-se uma mudança de paradigma, transformando uma sociedade altamente dependente de combustíveis fósseis, em uma baseada na utilização de recursos renováveis, acompanhada de um modelo econômico mais sustentável (Clark et al., 2006; Holm-Nielsen et al., 2006).

O grande desafio com o qual a humanidade se depara neste alvorecer do terceiro milênio é como conciliar, de forma sustentável, dois elementos essenciais

para sua sobrevivência: soberania energética e segurança alimentar. Os resultados expressivos alcançados pelo Brasil indicam claramente que o aumento da produção do álcool combustível não tem sido obtido em detrimento da produção de alimentos, que vem crescendo de forma expressiva. Isso tem sido comprovado desde que o Brasil adotou, em 1975, o Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), em resposta à primeira grande crise do petróleo (IEL/NC, 2008).

Por todas estas questões econômicas, geopolíticas e ambientais apresentadas, as atenções do mundo se voltam para fontes alternativas de energia, em especial para os biocombustíveis, como o etanol. Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis (biomassa), seja esta produzida especificamente com esse propósito, nos chamados cultivos energéticos – "Biocombustíveis de primeira geração" – ou obtida a partir de resíduos orgânicos de algum processo, caracterizando-a biomassa residual – "Biocombustíveis de segunda geração". Contudo, esta classificação nem sempre é simples, e muitas vezes não é adequada, dependendo da matéria-prima e dos processos utilizados, bem como de incertezas quanto aos impactos ambientais (UNEP, 2009).

Na atualidade, há um aumento global no desenvolvimento de técnicas que podem produzir materiais a partir de biomassa renovável, em um conceito de biorrefinaria, que incluem biocombustíveis, devido as flutuações no preço do petróleo e instabilidades políticas de várias regiões produtoras e problemas ambientais como o aquecimento global. Com isso, vários métodos que podem produzir biocombustíveis a partir de biomassa renovável estão sendo estabelecidas (Fujita et al., 2016), assim como os de outros produtos.

Neste contexto, cada vez mais o mundo se volta para a exploração de biomassas residuais. O aproveitamento de resíduos provenientes da agroindústria pode ajudar a resolver problemas ambientais associados à disposição dos mesmos no meio ambiente. O desenvolvimento de processos biotecnológicos que aproveitem estes resíduos aparece com grande potencial devido a possibilidade de agregar valor a uma matéria-prima subutilizada. Adicionalmente, a sua utilização pode ocorrer sem que haja competição com a produção de alimentos (Cinelli, 2012).

Todas essas questões tem impulsionado a busca por inovações em processos e por diferentes matérias-primas. A busca pela matéria-prima ideal, ou pelas matérias-primas ideais, avança rapidamente e apresenta uma regionalidade significante. Os requisitos desejados para estas matérias-primas incluem múltiplos fatores, não facilmente conciliáveis, tais como: disponibilidade, preço, qualidade em relação ao processo de conversão e sustentabilidade ambiental (Bomtempo, 2011).

Os processos hoje existentes para produção de etanol de primeira geração de fontes amiláceas, como o milho, a mandioca, a batata-doce, entre outros, apresentam a necessidade de realização de hidrólise do material, fazendo com que o amido seja convertido a açúcares fermentescíveis. A necessidade de hidrólise do amido gera elevação dos custos, entretanto a busca por processos que aperfeiçoem esta hidrólise se torna importante para a inclusão desta cultura na nova matriz energética nacional, além de desempenhar um papel fundamental no aproveitamento de diversas biomassas contendo amido para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos. Além disso, a produção de etanol de segunda geração apresenta desvantagens tais como elevado custo e dificuldades associadas ao pré-tratamento e a hidrólise dos compostos lignocelulósicos. Com isso há necessidade do estudo de pré-tratamentos e hidrólise desses materiais (Fujita et al., 2016; Baeyens et al., 2015; Maity et al., 2014), respeitando-se as características de cada biomassa.

Atualmente, o etanol (C_2H_5OH ou EtOH) é o biocombustível mais utilizado em veículos, podendo ser usado diretamente como combustível ou misturado à gasolina, elevando seu conteúdo de oxigênio e consequentemente permitindo uma elevação de octanagem do combustível, além de diminuir a emissão de gases poluentes (Dermibas, 2005).

O etanol pode ser obtido por diversas rotas (Figura 1) conforme o tipo de matérias-primas utilizadas que podem ser classificadas em (Santos, 2013):

Diretamente fermentescíveis: São matérias-primas que contém em sua composição substâncias que não precisam de nenhuma transformação para ser absorvidas e transformadas em etanol pelo microrganismo agente (exemplos: canade-açúcar, beterraba, sorgo sacarino).

Indiretamente fermentescíveis: A característica destas matérias-primas é que seus açúcares devem ser desdobrados (hidrolisados) antes de serem absorvidos pelo microrganismo agente da transformação em etanol:

Amiláceas e feculentas: Para que ocorra a fermentação etanólica destas matérias-primas, é necessária à hidrólise prévia que transforma o amido ou a fécula em açúcares fermentescíveis, são exemplos o milho, batata-doce e a mandioca. A hidrólise pode ser química ou enzimática;

Celulósicas: Compostas por celuloses e hemiceluloses, essas matériasprimas precisam de um pré-tratamento a fim de facilitar a hidrólise para açúcares fermentescíveis pelos microrganismos agentes da fermentação etanólica (folhas, casca de frutas, caules de plantas).



Figura 1 – Rotas de obtenção de etanol Fonte: Adaptado de BNDES (2008).

2.2 – Etanol de fontes indiretamente fermentescíveis

2.2.1 – Etanol de fontes amiláceas

A partir de 1973, viu-se grande aumento nos preços de petróleo, bem como a prevista exaustão ou drástica dificuldade de extração do petróleo com o passar dos anos. Em vários países do mundo observou-se o desenvolvimento de novas pesquisas para a descoberta, ou adaptação, de novas fontes de energia. O Brasil teve que se desenvolver no sentido de utilizar matérias-primas vegetais ricas em amido e açúcares para a produção de etanol, pois já se acreditava ser este o combustível mais adequado para substituir a gasolina e atender a demanda energética do país.

Segundo Camili (2010) a produção de bioetanol é efetuada em bases comerciais por duas rotas tecnológicas, utilizando matérias-primas doces, diretamente fermentescíveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba açucareira, ou matérias-primas amiláceas, como o milho o trigo e a mandioca, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) antes da fermentação.

He et al. (2009) afirmam que o amido é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza e representa uma importante fonte de biomassa para a produção de bioetanol. O Brasil e os Estados Unidos representam juntos cerca de 60% da produção mundial de etanol de cana e exploração de milho. A batata-doce apresenta rendimentos de duas a três vezes mais carboidratos fermentescíveis do que o milho de acordo ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2006).

De acordo com Camacho (2009) os Estados Unidos se destacam pelo crescente desenvolvimento de tecnologias que permitem aperfeiçoar os processos de produção de álcool a partir de milho. Já países como a China estão começando a investir em pesquisas que permitam desenvolver processos com outras matérias primas como a batata-doce, mandioca e sorgo, entre outras.

A questão do uso de matérias-primas amiláceas, com ênfase para a batata-doce, na produção de biocombustíveis não é recente. Keitt (1909) publicou um estudo onde foram avaliados os principais interferentes (produtividade e teor de matéria seca de raízes) no rendimento de etanol, sendo que Feltran & Valle (2009) sugeriram que a produtividade de raízes, por área, seria o principal fator restritivo. No entanto, verificou-se que a concentração de amido tem maior contribuição no rendimento de etanol que outros fatores (Boswell, 1944).

Peduzzi (2009) relatou a grande diversidade genética das amiláceas, que geradas e domesticadas no Brasil, especificamente na região amazônica, se mostram como uma boa alternativa em termos de adaptação de solo e clima, em relação a região sudeste, onde a cana de açúcar já foi domesticada e cultivada em grande escala.

O amido encontra-se na forma de grânulos formados por dois polímeros de glicose, a amilose, um polissacarídeo essencialmente linear, e a amilopectina, um polissacarídeo altamente ramificado. Os grânulos estão distribuídos em regiões cristalinas e amorfas, alternadas (Castro, 2009).

Para produção de etanol de amiláceas pode ser usada a hidrólise ácida que diminui o tempo relativo à sacarificação do amido, porém apresenta uma série de restrições, tais como corrosão de equipamentos, necessidade de correção do pH para a faixa de 5,0-6,0 da solução açucarada, destruição parcial dos açúcares e formação de açúcares não fermentescíveis (Martins, 2010).

A hidrólise enzimática atualmente é a mais utilizada: nesse processo o amido é hidrolisado em duas etapas a primeira é chamada de liquefação e libera dextrinas e uma pequena quantidade de glicose sendo que a segunda etapa é feita com a enzima glucoamilase e completa a sacarificação do amido (Cardona, Sánchez 2007). A hidrólise enzimática tem a vantagem de ser realizada em temperaturas mais brandas que a ácida além de não gerar subprodutos indesejáveis (Martins, 2010).

Várias fontes de amido podem ser usadas como matérias-primas para produção de etanol: entre eles o milho, utilizado em grande nos Estados Unidos, mandioca, arroz, trigo e a batata-doce (Cereda, 2002).

2.2.1.1 – Amido

O amido é um polímero de D-glucose, composto por cerca de 30% de amilose, uma cadeia linear de α 1-4 unidades de glicose ligada a uma estrutura helicoidal, e 70% de amilopectina, um polímero altamente ramificado com adicional α 1-6 ligações glicolíticas (Wyman & Brethauer, 2009). Segundo Camacho (2009) as características físico-químicas do amido presente no milho, na cevada, no trigo e nas tuberosas amiláceas como a mandioca, a batata entre outras, permitem visualizar estas culturas com potenciais matérias-primas para produção de etanol. No Brasil a produção de etanol é tradicionalmente baseada na cultura da cana-deaçúcar, mas as necessidades energéticas no mundo viabilizam a produção de etanol a partir de outras fontes alternativas como as amiláceas.

O amido é um polissacarídeo de reserva das plantas e fornece a base para a nutrição humana e animal. Compreender as relações entre as propriedades estruturais e funcionais do amido de batata-doce é muito importante para a otimização das aplicações industriais. O polímero de glicose possui dois componentes principais: a amilose e a amilopectina. As unidades de glicose estão ligadas por meio de ligações glicosídicas α -(1-4) e α -(1-6), sendo que normalmente a batata-doce é composta por 20-30% de amilose que é a parte linear da cadeia e de 70-80% de amilopectina que é a parte ramificada da cadeia do amido (Zhu & Wang, 2014).

Conforme Öner et al. (2005) a bioconversão de amido em etanol é um processo que envolve duas etapas. O primeiro passo é sacarificação, onde o amido é convertido em açúcar através de um microrganismo, ou enzimas amilolíticas, tais como glucoamilase e a α -amilase. O segundo passo é a fermentação, onde o açúcar é convertido em etanol usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A utilização de leveduras amilolíticas para a fermentação direta do amido é uma alternativa ao processo convencional de múltiplos estágios, que oferece uma baixa viabilidade econômica. Embora existam mais de 150 espécies de leveduras amilolíticas, a sua utilização industrial ainda é limitada, devido à sua baixa tolerância ao etanol.

Silveira (2008), pesquisando a batata-doce evidenciou que além da capacidade elevada de produção de etanol, principalmente em cultivares de elevado teor de amido nas raízes, os subprodutos derivados do processo fermentativo têm características adequadas ao uso na alimentação animal, podendo melhorar o resultado econômico das unidades de processamento. Este fato pode ajudar a viabilizar economicamente o processo de produção de etanol a partir da batata-doce.

2.2.1.2 – Batata-doce

A batata-doce é uma dicotiledônea da família Convolvulaceae, possivelmente originária das Américas Central e do Sul, embora alguns autores afirmem que essa hortaliça tenha sua origem na Ásia ou África (Hackenhaar, 2012).

Pertencente à família das convolvuláceas, do gênero *Ipomoea* e à espécie *Ipomoea batatas L.*, é uma planta de constituição herbácea, rastejante verde ou arroxeada; chega a alcançar de 3 a 5 m de comprimento. Suas raízes são tuberosas e variam de forma, tamanho e coloração, conforme a cultivar e o meio ambiente em que são produzidas. Por ser uma planta natural de regiões quentes,
essa cultura requer temperaturas elevadas durante todo o ciclo vegetativo (Silveira, 2008). É uma hortícula tipicamente tropical e subtropical, originária da América Central e do Sul, rústica de fácil manutenção com boa resistência a seca e ampla adaptação (Miranda et al., 1995).

A batata-doce é uma espécie dicotiledônea. Sabendo que cada semente botânica pode gerar um clone com potencial para originar uma nova cultivar, e que em cada cápsula deiscente, pode-se obter quatro sementes em uma única cápsula, e se ter quatro cultivares completamente distintas; característica botânica que confere à batata-doce uma ampla potencialidade para melhoramento genético (Bioex Etanol, 2010).

Atualmente os maiores produtores de batata-doce estão na Ásia e África continentes que correspondem a 80% e 17% da produção mundial respectivamente. A China é o maior produtor, concentrando mais de 60% da produção mundial. Ainda que a Ásia seja responsável pela maior parte da produção, a cultura de batata-doce é cultivada em várias partes do globo sendo plantada em 118 países (FAO, 2014).

Caracteriza-se por ser uma cultura típica de áreas geográficas de baixa fertilidade, desenvolvendo-se bem em qualquer tipo de solo, desde os francos arenosos até os mais argilosos. Entretanto, consideram-se como ideais os solos mais leves, soltos, permeáveis, bem drenados e com boa aeração. É considerada como tolerante à acidez do solo, podendo crescer e produzir bem em solos com pH entre 4,4 a 7,7, sendo o intervalo ideal entre 5,6 e 6,2 (Silveira et al., 2008)

Excesso de umidade nos estágios iniciais de formação das raízes tuberosas pode inibir o processo de tuberização, e pode, em estágios mais avançados, promover podridões de raízes (Maluf, 2014). Ainda pouco utilizada para esta finalidade, a batata-doce talvez seja uma das espécies vegetais que podem apresentar os melhores resultados para a produção de etanol no Brasil, já que tem mais alto rendimento de amido por terra cultivada do que os grãos (Duvernay et al., 2013; Lareo, 2013; Gonçalves Neto et al., 2012).

Utilizando batata-doce industrial, experimentos feitos na Universidade Federal do Tocantins chegaram a obter rendimentos de etanol variando entre 17.354 e 20.007 litros por hectare. Estes valores são significativos quando comparado aos obtidos pela cana-de- açúcar (Pavlak et al., 2011).

Um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Tocantins – UFT estuda a cultura da batata-doce desde 1997 no Tocantins, e já desenvolveu dez

cultivares voltadas para a produção de etanol, tendo a sua produção focada na agricultura familiar, a qual atualmente se encontra às margens do crescente mercado de etanol em nível mundial (Silveira, 2008). Estas cultivares possuem a cor da polpa clara (branca ou creme), característica varietal que está correlacionada o teor de matéria seca e esta ao teor de amido (Silveira, 2007). De acordo com Pavlak et al. (2011) uma cultivar que merece destaque é a cultivar 'Duda', que apresenta película externa roxa e polpa branca, de formato irregular, alongado, redondo e muito desuniforme. A produtividade média obtida, nos últimos 5 anos, foi de 65,5 t/ha, o teor de matéria seca de 40,4%, podendo conferir neste caso rendimentos de 161,04 litros de etanol por tonelada de raiz.

Para Miranda et al. (1995) o potencial de produção da batata-doce é enorme, por ser uma das plantas com maior capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo. Comparada com culturas como arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce, conforme Silva et al. (2002), é mais eficiente em quantidade de energia líquida produzida por unidade de área e por unidade de tempo. Isso ocorre porque a cultura produz grande volume de raízes em ciclo relativamente curto, a um custo baixo, durante o ano inteiro. Em termos de volume de produção mundial, a cultura ocupa o sétimo lugar, mas é a décima quinta em valor da produção, o que indica ser universalmente uma cultura de baixo custo de produção. Neste contexto, tem-se verificado um baixo investimento na cultura da batata-doce no Brasil, gerando-se com isso, uma baixa lucratividade, e, por conseguinte, um baixo investimento tecnológico nesta área.

Abegunde et al. (2013) em seus estudos relataram que a China responde por cerca de 90% da produção de batata-doce em todo o mundo, com uma produção anual de 117 milhões de toneladas. Com uma produção significativa, a China destaca-se também com pesquisas utilizando a batata-doce como substrato para a produção de etanol como mostra o Quadro 1.

	Deservises						
Autores	Pesquisas						
Abegunde et al., 2013	Physicochemical characterization of						
	sweet potato starches popularly used in						
	Chinese starch industry						
Cao et al., 2011	Simultaneous saccharification and						
	fermentation of sweet potato powder for						
	the production of ethanol under						
	conditions of very high gravity						
Cui et al., 2010	Changes in volatile compounds of sweet						
	potato tips during fermentation						
Jin et al., 2012	Comparison of ethanol production						
	performance in 10 varieties of sweet						
	potato at different growth stages						
Wang et al., 2013	Life-cycle energy efficiency and						
	environmental impacts of bioethanol						
	production from sweet potato						
Zhang et al., 2011	Application of simultaneous						
	saccharification and fermentation (SSF)						
	from viscosity reducing of raw sweet						
	potato for bioethanol production at						
	laboratory, pilot and industrial scales						
Zhang et al., 2013	Starch saccharification and fermentation						
	of uncooked sweet potato roots for fuel						
	ethanol production						

Quadro 1 – Pesquisas realizadas na China utilizando a batata-doce como substrato para a produção de etanol.

No Brasil, a batata-doce é a quarta hortaliça mais cultivada, sendo produzidas, em 2010, 505,3 mil toneladas em 39.393 hectares, com produtividade média de 13,1 toneladas por hectare de raiz (IBGE, 2012). O Rio Grande do Sul é o estado com a maior área plantada (12.600 hectares), com uma produção de 154.071 toneladas e rendimento médio de 12,5 toneladas por hectare. No estado de Minas Gerais foram produzidas em 2010, 37.632 toneladas de batata-doce, com área cultivada de 2.330 hectares e rendimento médio de 16,2 toneladas por hectare (IBGE, 2012).

Baixas produtividades podem ser ocasionadas pelo desconhecimento de práticas culturais adequadas, e atribuídas à utilização de materiais genéticos (cultivares) obsoletos, suscetíveis a pragas e doenças de solo, principalmente a insetos crisomelídeos, à broca da raiz, e aos nematóides de galhas do gênero *Meloidogyne* spp.

Barrera (1986) relatava que a produção de álcool a partir de batata-doce era altamente desejada não só pela larga possibilidade de cultivo deste produto no território brasileiro, mas também porque era importante a busca de sucedâneos da cana-de-açúcar para alimentar as destilarias que conquistaram o Brasil na esteira do Pró-Alcool.

Os estudos existentes na literatura reportam sobre a produção de etanol a partir da raiz da batata-doce, conforme apresentado na Tabela 1.

Poforôncia	Pogião do Cultivo	Processo	Condições do	
Referencia	Região de Cultivo	Utilizado	Processo	
			Amilase: 6,4	
BETIKU et al.,	Nicéria	Hidrólise	units/mL	
2013	муспа	enzimática	Sacarificação:	
			789,6 units/mL	
CAO et al., 2011		Sacarificação e	Amilase: 4 a 40U/g	
	China	fermentação	pH: 4,5-4,8	
		simultânaas	T: 50°C	
		Sinulaneas	t: 2h	
			Carga de sólidos:	
	Brasil	Hidráliaa	10, 15 e 20%	
EBURNEO, 2009		enzimática	Hidrólise: 90°C/2h	
			Sacarificação:	
			60º/17h	
FERRARI et al.,	Uruquai	Sacarificação e	30°C/14-48b	
2013	Oruguar	fermentação	00 0/14-4011	

Tabela 1 – Referências de estudos encontrados na literatura sobre a produção de etanol a partir das raízes da batata-doce.

		simultâneas	
JIN et al., 2012	China	Hidrólise enzimática	10 min, 85°C, pH 5.2, 120 KNU/kg de amido
LEE et al., 2012	Taiwan	Sacarificação e fermentação simultâneas	рН 4.0 30°С
PAVLAK et al., 2011	Brasil	Hidrólise enzimática	Liquefação: 90ºC/1h Sacarificação: 60ºC/1h
SANTANA et al., 2013	Brasil	Hidrólise enzimática	Liquefação: 90ºC/1h Sacarificação: 60ºC/1h
SOUZA, 2005	Brasil	Hidrólise enzimática, fermentação por meio de células imobilizadas	Liquefação: 90°C/1h Sacarificação: 60°C/1h Microrganismo: Saccharomyces cerevisiae
SRICHWONG et al., 2012	Japão	Sacarificação e fermentação simultâneas com batatas-doces desenvolvidas com cadeias de amilopectina mais curtas	Coquetel de enzimas: 0,4FPU/g, 43,0 PGU/g E 0,2 FBG/g Liquefação: 50- 100°C Microrganismo: <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
WALUYO et al.,	Indonésia	Hidrólise	-

2015		enzimática	
			Enzimas: α-
			amilase e
ZHANG et al., 2011			glucoamilase
		Sacarificação e	pH: 5,0
	China	fermentação	T: 30°C
	Grina	simultâneas	Glucoamilase:
		Sinulaneas	1,6AGU/g
			α-amilase:
			0,12KNU/g
			t: 0-3h

Sabendo que todo parque tecnológico é voltado para produção de etanol a partir da cana-de-acúçar, fica claro neste momento a viabilidade do uso da batata--doce para produção de biocombustível de segunda geração, sem a intenção de substituir a cana, mas complementar a produção de etanol (Gonçalves Neto et al., 2012).

Além disso, a batata-doce pode produzir álcool, produto de alto valor agregado, destinado à fabricação de cosmético, tintas e remédios (Castro, 2009).

2.2.2 – Etanol Lignocelulósico

Para que a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos seja possível é necessária uma etapa para ruptura da estrutura da matriz do material fibroso (Figura 2) e liberação dos açúcares fermentescíveis (Milesse, 2012).



Figura 2 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica Fonte: Silva, 2009.

Com a hidrólise das estruturas de celulose e hemicelulose a açúcares mais simples, pode então ser realizada a etapa de fermentação na qual pode ser utilizada uma variedade de microrganismos embora na literatura científica tenham destacados espécies como *Saccharomyces cerevisiae e Zymomonas mobilis para a* fermentação de glicose e *Scheffersomyces (Pichia) stipitis e Candidas hehatae* para fermentação de xilose (Lemos et al. 2012; Milesse, 2012; Ferreira, 2010; Dussán, 2013).

2.2.2.1 – Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos compreendem os resíduos agroindustriais e florestais, tais como bagaços, palhas e cavacos de madeiras, e sua composição varia de acordo com a espécie (Martiniano, 2013). A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima com maior potencial para a produção de biocombustíveis dentro do conceito de biorefinaria, pois tem atraído à atenção especial em todo o mundo nesse conceito de geração de energia (Silva et al., 2013; Cai et al., 2016).

São fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentam grande potencial como matéria-prima em processos industriais para produção de alimentos, combustível, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos. Seu não aproveitamento, além de acarretar possíveis impactos ambientais por ocasionarem problemas de poluição, representa perda de recursos, uma vez que poderiam ser aproveitados na geração de produtos de interesse à sociedade (Canilha et al., 2009; Cortez, 2010).

Esta biomassa é constituída basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e em menores proporções os extrativos como as graxas, gomas, amidos, alcalóides, resinas, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos; e os não extrativos que incluem compostos como sílica, carbonatos e oxalatos (Lynd et al., 2005). As cadeias de celulose se mantêm compactadas por meio de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto que a lignina une os componentes e age como uma barreira física para o ataque de microrganismos e água. As hemiceluloses proporcionam a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa (Rabelo, 2010).

2.2.2.1.1 – Celulose

Celulose é um polímero composto de uma cadeia linear de centenas a milhares de unidades de glicose (Figura 3) ligadas por ligações β (1 \rightarrow 4). As cadeias de celulose estão associadas formando fibrilas. Essas fibrilas apresentam-se na forma de cabos e são insolúveis em água e na maior parte dos solventes orgânicos (Haghighi Mood et al., 2013; Mohnen et al., 2009).

A biomassa das plantas contém de 40 a 50 % de molécula de celulose que estão rigidamente unidas por ligações de hidrogênio. Devido a essas ligações e ao arranjo em fibrilas a celulose natural tem uma estrutura compacta denominada cristalina, e também uma estrutura amorfa a qual pode ser mais facilmente hidrolisada por enzimas (Anwar et al., 2014 ; Zhao et al., 2012).



Figura 3 – Subunidade (glicose) e fórmula estrutural da celulose Fonte: ROSA; GARCIA (2003).

2.2.2.1.2 – Hemicelulose

As hemiceluloses são um polímero heterogêneo que tem sua estrutura principal formada por glucuronoxilanas e glucomananas (Figura 4). Ao contrário da celulose, a composição das hemiceluloses varia dependendo do tecido celular e da espécie da planta e se diferencia em relação ao tipo de ligação glicosídica, composição da cadeia lateral e grau de polimerização (Haghighi Mood et al., 2013; Zhao et al., 2012)



Figura 4 – Arranjo de pentoses formando a estrutura molecular da hemicelulose Fonte: ROSA; GARCIA (2003).

Em geral as biomassas folhosas são compostas principalmente por heteroxilanas altamente acetiladas já as madeiras de coníferas apresentam uma elevada proporção de glucomananas e galactoglucomananas parcialmente acetiladas e uma proporção de glucomananas e galactoglucomananas parcialmente acetiladas (Carvalho et al., 2010).

Arabinanas e arabino-galactana estão presentes embora elas não compartilhem a ligação β (1 \rightarrow 4) da estrutura principal. Normalmente biomassas vegetais contêm de 25% a 35% de hemiceluloses com massa molar média menor que 30.000. Esse baixa massa molar associada a estrutura ramificada com cadeia curtas tornam as hemiceluloses facilmente hidrolisáveis (Anwar et al., 2014; Haghighi Mood et al., 2013).

2.2.2.1.3 – Lignina

Dentre os principais componentes das fibras vegetais a lignina é a mais complexa e a que está presente em menor quantidade. Caracteriza-se por ser um polímero aromático sintetizado com base em fenilpropanóides (Figura 5). A maioria das unidades de fenilpropanos da lignina são formadas por sinrigil, guaiacil e phidróxi fenóis unidos por um conjunto de ligações formando uma matriz complexa.



Figura 5 – Estrutura molecular de uma subunidade da lignina. Fonte: ROSA; GARCIA (2003).

A lignina age como uma agente agregante preenchendo os espaços entre a celulose e as hemiceluloses (Anwar et al., 2014; Haghighi Mood et al., 2013).

As ligninas de madeiras de coníferas são compostas quase que exclusivamente por unidades guaiacil, sendo denominadas de ligninas tipo G, as ligninas de madeiras de folhosas são mais ricas em unidades siringil, sendo denominadas de ligninas tipo GS (Carvalho et al., 2009).

2.2.2.2 – Pré-tratamentos

O aproveitamento total do material lignocelulósico requer métodos de prétratamento ou fracionamento que são complexos, tem baixo rendimento e ainda não são capazes de isolar completamente cada componente sem modificá-los ou degradá-lo (Canilha et al., 2009). Há ainda uma restrição severa na acessibilidade das enzimas usadas para hidrolisar a estrutura rígida dos materiais lignoceulósicos (Cai et al., 2016). Com isso, faz-se necessário a realização de pré-tratamentos a fim de: i) modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica; ii) reduzir o tamanho das partículas e a cristalinidade da celulose; iii) aumentar a área de contato e assim a acessibilidade e porosidade da biomassa lignocelulósica (Licari et al., 2016).

As técnicas de pré-tratamento podem ser descritas como sendo físicas, químicas, biológicas e a combinação destes. Os objetivos do pré-tratamento são sem causar a perda ou degradação dos açúcares, obter maior efetividade no processo de hidrólise enzimática realizado posteriormente, fazendo com eficiência da conversão dos polímeros de celulose e hemiceluloses em açúcares fermentescíveis, maximizando a produção de biocombustíveis ou outros produtos químicos.

Contudo, até o momento não é reportado na literatura estudos sobre o pré-tratamento para a produção de etanol a partir das ramas da batata-doce, alguns autores reportam a utilização das ramas de batata-doce na alimentação animal, por possuírem alto teor de proteína bruta e boa digestibilidade, podendo serem usadas, principalmente, na alimentação de gado leiteiro, tanto na forma fresca como silagem (MONTEIRO, 2007). No Brasil, no entanto, a utilização de ramas de batata-doce na alimentação animal é feita em escala bastante limitada e a maior parte das ramas é simplesmente descartada como resíduo inaproveitável (ANDRADE JÚNIOR et al., 2012). Levando-se este ponto em consideração este trabalho investigará o potencial das ramas de batata-doce para a produção de etanol de segunda geração e a cogeração de energia. A Tabela 2 apresenta algumas formas de pré-tratamento disponíveis na literatura, que foram empregados para outros materiais lignocelulósicos.

Mátodos do Pró	Remoção	Remoção da	Aumento	Descristalização	Aumento	Geração
tratamantaa	de lignine		ua area		da	de
tratamentos	ua lignina	nemicelulose	ue	ua celulose	porosidade	inibidores
			contato			
Moagem	-	-	А	A	-	В
Alcalino	А	А	А	-	А	В
Ácido	М	А	А	-	М	А
Oxidativo	А	-	-	-	А	В
Organosolv	А	В	А	-	М	В
Líquidos iônicos	М	В	А	А	А	В
Explosão a vapor	В	А	А	В	A	А
Hidrotérmico	Μ	А	М	-	Μ	А
AFEX	М	В	А	A	А	В
Explosão com $\overline{CO_2}$	В	В	A	-	A	В
Biológico	А	М	А	-	А	В

Tabela 2 – Efeito dos diferentes pré-tratamentos na composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos.

A: efeito alto; M: efeito médio; B: efeito baixo

Fonte: Sun et al., 2016.

2.2.2.2.1 – Pré-tratamentos Físicos

2.2.2.2.1.1 - Moagem

Pré-tratamentos físicos são destinados a aumentar a área superficial e tornar mais acessível a biomassa lignocelulósica para as enzimas, contudo há a redução do tamanho das partículas ou a desordem da estrutura. A moagem é utilizada a fim de se reduzir o tamanho das partículas dos materiais lignocelulósicos e facilitar os passos seguintes do pré-tratamento; pode reduzir significativamente além do tamanho das partículas o grau de cristalinidade e consequentemente melhorar a hidrólise enzimática desses materiais.

2.2.2.2.2 – Pré-tratamentos Químicos

2.2.2.2.2.1 – Alcalino

O pré-tratamento alcalino é um método comumente usado para remover a lignina e as hemiceluloses dos materiais lignocelulósicos (Sun et al., 2016). O prétratamento alcalino causa diversas transformações na estrutura dos materiais lignocelulósicos, tais como quebra da barreira de lignina, descristalização da celulose e solvatação das hemiceluloses: também hidrolisa vários ácidos urônicos e estéres que são prejudiciais a hidrólise enzimática (Anwar et al., 2014; Sarkar et al., 2012).

Vários reagentes alcalinos são usados para promover o pré-tratamento alcalino, tais como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ e amônia. Entretanto, os mais utilizados são hidróxidos de sódio e hidróxido de potássio (Sun et al., 2016), embora essas podem se combinar permanentemente com os materiais lignocelulósicos formandos sais e aumentando o custo do processo. Uma alternativa é o hidróxido de cálcio, este possui um custo relativamente menor que os outros e ainda pode ser recuperado utilizando CO₂ (Balat, 2011).

De acordo com suas características o pré-tratamento alcalino tem sido relatado como o mais eficiente a ser usado em resíduos de agricultura e culturas herbáceas, considerando que nesses o teor de lignina é menor, e por consequência a ação na celulose é maior, melhorando a hidrólise enzimática (Galbe; Zacchi, 2012).

2.2.2.2.2.2 – Ácido diluído

O pré-tratamento com ácido é considerando uma das técnicas mais importantes quando se deseja obter alto rendimento de açúcares de materiais lignocelulósicos. Esse pré-tratamento é geralmente realizado usando ácidos minerais diluídos com concentrações que variam de 0,2 a 2,5% (m/m) em temperaturas que variam de 130 a 210°C (Sarkar et al., 2012).

O ácido sulfúrico é o mais empregado nesse tipo de pré-tratamento hidrolisando polissacarídeos a monossacarídeos, aumentado a acessibilidade da celulose para a hidrólise enzimática (Haghighi Mood et al., 2013).

O tempo de reação pode variar de vários minutos a horas, sendo que nesse tempo o ácido age indiscriminadamente nas cadeias poliméricas de carboidratos. O resultado é uma mistura complexa de vários compostos, dentre estes alguns tóxicos, potencialmemte inibidores, aos microrganismos fermentadores (Galbe; Zacchi, 2012).

Na aplicação do pré-tratamento com ácido diluído um importante dado a se considerar é o fator combinado de severidade (FCS). Este é valor que combina dados de temperatura, tempo e concentração de ácido utilizados em um processo.

As desvantagens do pré-tratamento ácido são: gastos com reatores resistentes a corrosão; necessidade de neutralização do hidrolisado antes da fermentação; formação de inibidores do processo fermentativo; necessidade de descarte correto dos sais formados na neutralização; em princípio necessidade da etapa de redução de tamanho das partículas da biomassa antes do pré-tratamento a ser aplicado (Balat, 2011).

2.2.2.2.2.3 – Oxidação úmida

Na oxidação a biomassa é tratada com água mais ar ou oxigênio em temperaturas superiores a 120°C. Esse tratamento libera, mas não hidrolisa completamente as hemiceluloses, gerando carboidratos oligômeros (Sarkar et al., 2012).

Oxidação úmida é preferencialmente aplicável para biomassa com conteúdo baixo de lignina já que no processo a lignina é solubilizada não podendo ser usada como combustível sólido (co-geração), prejudicando a produção de etanol em larga escala (Galbe; Zacchi, 2012).

A oxidação úmida tem a grande vantagem de produzir poucos inibidores, mas sua aplicação é seriamente comprometida devido aos custos dos equipamentos pressurizados e do oxigênio (Haghighi Mood et al., 2013).

2.2.2.2.2.4 – Organosolv

Pré-tratamento por solvente orgânico ou organosolv é o um método alternativo para fazer a deslignificação de materiais lignocelulósicos (SARKAR et al., 2012). O Organosolv se baseia na premissa que a lignina é solúvel em alguns solventes orgânicos. Os solventes utilizados podem ser metano, etanol, acetona entre outros. O pré-tratamento pode ser aplicado com ou sem catalisador (em geral um ácido mineral) a fim de melhorar os resultados (Galbe; Zacchi, 2012; Sarkar et al., 2012).

O solvente age quebrando as ligações de lignina e hemiceluloses, geralmente liberando lignina com alto grau de pureza, a qual pode ser utilizada em outras aplicações. Além disso, com remoção da lignina há um aumento da área superficial do material melhorando a hidrólise enzimática (Haghighi Mood et al., 2013).

Entres as principais desvantagens desse processo estão a volatilidade e inflamabilidade dos solventes utilizados. Para que o processo seja viável é necessário a recuperação dos solventes, o que evita também a inibição nas etapas posteriores de hidrólise e fermentação (Galbe; Zacchi, 2012).

2.2.2.2.2.5 – Líquido iônico

Líquido iônico consiste de sais fundidos a temperatura ambiente formados por cátions e ânions orgânicos. Líquidos iônicos possuem boa ação solvente, baixa volatilidade, estabilidade química e baixo ponto de fusão tornando-os aplicáveis a diversos processos (Xiao et al., 2012). Apresentam grande potencial no prétratamento de materiais lignocelulósicos sendo capazes de solubilizar celulose, ligninas e hemiceluloses (Galbe; Zacchi, 2012; Haghighi Mood et al., 2013).

Embora tenha várias vantagens ainda há pouca tecnologia no que tange a recuperação dos líquidos iônicos dos processos. Apesar de não se ter evidências que eles possam inibir a fermentação, o grande fator negativo é que líquidos iônicos ainda têm um custo alto (Galbe; Zacchi, 2012).

2.2.2.3 – Pré-tratamentos físico-químicos

2.2.2.3.1 – Explosão de vapor

No pré-tratamento por explosão de vapor a biomassa é aquecida em temperaturas que variam de 160 a 290°C a pressões que vão de 20 a 60 bar por

alguns minutos, o processo finaliza com um rápida descompressão para pressão ambiente (Sarkar et al., 2012).

A maior parte das modificações provocadas pelo método de explosão de vapor pode ser atribuída à remoção quase que completa das hemiceluloses. Dessa forma há um aumento da acessibilidade das enzimas a celulose, além da redução de tamanho das partículas e aumento dos poros provocados pela descompressão (Mosier et al., 2005).

O método é às vezes chamado de auto-hidrólise, pois provoca a decomposição de hemicelulose podendo formar ácidos como fórmico, acético e levulínico, os quais podem servir como catalisadores e ao mesmo tempo degradar açúcares a furfural e hidróxi-metil-furfufal (HMF) (Haghighi Mood et al., 2013).

Vale ressaltar que ao contrário do pré-tratamento hidrotérmico, a explosão de vapor não provoca a diluição excessiva dos açúcares, além de ter as mesmas características de redução de tamanho das partículas (Balat, 2011; Mosier et al., 2005).

2.2.2.3.2 – Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico pode ser aplicado em uma faixa de temperatura e pressão. Em alguns casos, usa alta pressão para manter a água líquida em temperaturas que podem variar de 200 a 230°C. Esse tratamento pode solubilizar de 40% a 60% da biomassa total, tem melhor efeito nas hemiceluloses que pode ser completamente removida (Mosier et al., 2005). É possível realizar o pré-tratamento dentro do conceito do processo hidrotérmico com temperaturas ao redor de 120 °C e pressões levemente acima da atmosfera, endógenas com água em uma autoclave (Tovar et al., 2014).

Esse pré-tratamento libera pequenas quantidades de compostos indesejáveis como furfural e ácidos carboxílicos capazes de inibir o crescimento microbiano prejudicando a fermentação (Sarkar et al., 2012).

Outra desvantagem do método é que os açúcares liberados pela hidrólise das hemiceluloses ficam altamente diluídos no meio, o que pode diminuir a eficiência do processo fermentativo, sendo necessária a concentração destes (Galbe; Zacchi, 2012). O principal fator a favor da viabilidade econômica deste método é que ele não usa nenhum composto químico tóxico e gera poucos resíduos (Sarkar et al., 2012).

2.2.2.3.3 – Explosão de fibra com amônia (AFEX) e Explosão com CO2

O pré-tratamento AFEX ocorre aquecendo amônia líquida junto ao material lignocelulósico a temperaturas que variam de 60 a 100°C e sob alta pressão entre 900 a 1700 KPa, finalizando com rápida descompressão, semelhante ao que ocorre no pré-tratamento por explosão de vapor (Balat, 2011).

Nesse processo a rápida expansão da amônia provoca o rompimento das ligações da lignina aumentando a digestibilidade da biomassa em relação ao tratamento enzimático (Haghighi Mood et al., 2013). O processo também não libera nenhum açúcar diretamente, além de ser conduzido em temperaturas moderadas o que contribui para não formação de inibidores (Balat, 2011; Sarkar et al., 2012).

Este pré-tratamento tem a desvantagem de ser menos eficiente em biomassas com alto conteúdo de lignina, além de causar a solubilização apenas de uma pequena porção do material (Sarkar et al., 2012).

Outra desvantagem do método é que a amônia tem muita toxidade e necessita ser recuperada com boa eficiência para que o processo seja economicamente viável (Galbe; Zacchi, 2012).

O pré-tratamento de explosão com CO₂ tem ação semelhante ao AFEX, embora o CO₂ tenha como vantagem o custo bem menor em relação, além da recuperação fácil por despressurização. Como desvantagem pode se destacar a formação de ácido carbônico durante o processo, capaz de corroer os equipamentos (Haghighi Mood et al., 2013).

2.2.2.3.4 – Ozonólise

A ozonólise emprega o gás ozônio para quebrar a lignina e as hemiceluloses e aumentar a degradabilidade da celulose. Esse pré-tratamento é geralmente conduzido em temperatura ambiente, e é bastante eficiente na remoção da lignina sem a formação de compostos tóxicos (Balat, 2011). Por ser feito a temperatura ambiente o processo tem baixo gasto energético, no entanto a principal desvantagem é a grande quantidade de ozônio utilizada o que eleva significativamente o custo final (Haghighi Mood et al., 2013).

2.2.2.2.4 – Pré-tratamento Biológico

O pré-tratamento pode ser feito utilizando tanto enzimas como microrganismos. O pré-tratamento usando microrganismos geralmente emprega fungos da podridão mole e branca, entretanto, fungos da podridão marrom podem ser usados (Galbe; Zacchi, 2012; Sarkar et al., 2012).

Fungos da podridão mole e branca degradam a lignina da biomassa liberando dessa forma mais celulose melhorando a ação das enzimas. Apesar do baixo consumo energético do processo que é conduzido a temperatura ambiente e do pouco investimento necessários para os reatores, o pré-tratamento biológico encontra dificuldade para aplicação em larga escala (Anwar et al., 2014).

Pré-tratamento por rota biológica tem como desvantagem apresentar um tempo de reação maior que os demais pré-tratamentos, o que acarreta no emprego de equipamentos de grande porte com impacto no capital a ser investido, além de exigir muito espaço e monitoramento contínuo do crescimento dos microrganismos (Haghighi Mood et al., 2013).

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos na literatura, todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa lignocelulósica para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa lignocelulósica (Gámez et al., 2006, Laser et al., 2002; Cunha et al., 2001). A Tabela 2.1 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos citados anteriormente. A Tabela 2.2 apresenta os principais estudos nos distintos materiais lignocelulósicos presentes na literatura.

Métodos de Pré-tratamento	Maiores vantagens	Maiores desvantagens		
	Aumento da área de			
Moagem	superfície e redução da	Alto consumo de energia		
	cristalinidade			
	Redução do conteúdo de	Alta poluição e custo pa		
Alcalino	lignina e hemicelulose e			
	baixo custo			
Ácido	Redução do conteúdo de	Problemas na		
Aciuo	hemicelulose e baixo custo	recuperação química		
Ovidativa	Eficiência na remoção de	Custo elevado de agentes		
Oxidativo	lignina	de branqueamento		
Organosolv	Alta separação e	Alto custo com solventes		
	recuperação da lignina	orgânicos		
	Redução da cristalinidade	Alta quata com os líquidos		
Líquidos iônicos	dos materiais	Alto custo com os líquidos		
	lignocelulósicos	IONICOS		
	Solubiliza a hemicelulose,	Alto custo com		
Explosão a vapor	desarranja a estrutura da	equipamentos e geração		
	lignina e tem custo eficaz	de inibidores		
	Solubiliza a hemicelulose e	Alto queto com		
Hidrotérmico	gera açúcares a partir da			
	hemicelulose	equipamentos		
	Hidrolisa a clulose e	Alto queto com		
AFEX	aumenta a área de			
	superfície	equipamentos e amonia		
Evaloção com CO	Aumento da área de	Alto custo com		
Explosad colli CO_2	superfície	equipamentos		
Piológico	Degrada a lignina e	Períodos longos no pré-		
Diologico	hemicelulose	tratamento		

Tabela 2.1 – Principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.

Fonte: Sun et al., 2016

Referência	Diamagaa	Tipo de pré-	Cataliandar	Concentração	Carga de	Temperatura	Tempo	Pressão	Rendimento
Referencia	DIOMASSA	tratamento	Catalisador	(%)	biomassa (%)	(°C)	(min)	(MPa)	(%)
LIU et al.,	Palha de	Ácido		27.26		70.05%0	45.00		
2012	milho	concentrado	П2304	27-30	-	70-65 C	40-90	-	-
						100			
	Degee					115			
	вадаçо	Alcalino	NH_3	28	20	130	60	-	-
al., 2012	ae sorgo					145			
						160			
SUN et al.,	Pombu	Ácido		27		00	60		
2013	Dambu	Acido	H ₂ SO ₄	21	-	00	00	-	-
SCHELL et	Palha de	Ácido diluído +			20.20	100	10		
al., 1992	milho	Hidrotérmico	-		20-30	100	10	-	-
SCHELL et	Palha de	Ácido diluído	H.SO.	1 16	20	170	6.2		
al., 2003	milho		Π ₂ ου ₄ 1,10	1,10	1,10 20	175	0,2	-	-
WAYMAN	Palha de	Ácido +	50	2	22	160	20	0.5	
et al.,1988	milho	Hidrotérmico	30 ₂	3	33	100	30	0,5	-
SAHA;	Eibra de								
BOTHASH		Ácido diluído	H_2SO_4	0,5	15	121	60	-	-
, 1999	mino								

 Tabela 2.2 – Referências de estudos encontrados na literatura de diversas formas de pré-tratamento.

ALLEN et al., 2001	Fibra de milho	Hidrotérmico	H ₂ O	-	5-10	210-220	2	5,8	-
PETERSE N et al., 2009	Palha de trigo	Hidrotérmico	H ₂ O	-	-	185-195	6-12	-	-
CHEN et al., 2008	Palha de trigo	Explosão a vapor	Peróxido alcalino	-	-	198	10	1,5	-
MARTÍN et al., 2007	Bagaço cana-de- açúcar	Oxidação úmida	H ₂ O	-	20	185-195	5-15	1,2	50,5-80
KAAR et al., 1998	Bagaço cana-de- açúcar	Explosão a vapor	-	-	-	188-243	0,5-44	-	78-99
MONTANE	Palha de	Explosão a	NaOH	0.1	-	180	20	-	-
et al., 1995	trigo	vapor	Naon	0,1		205	2	-	-
ÖHGREN	Palha de	Explosão a	SO.	3.0	20	190-200	5	-	58-90
et al., 2005	milho	vapor	502	3,0	20	170	9	-	
GALBE et al., 2002	Bagaço cana-de- açúcar	Explosão a vapor	SO ₂	-	-	180-205	5-10	-	-

ROCHA et al., 2013	Bagaço cana-de- açúcar	Hidrotérmico	NaOH	1,0	-	100	60	-	49,7-62,1
TERAMUR A et al., 2013	Palha de arroz	Ácido diluído	H ₂ SO ₄	1	-	180	45	-	-
YANG et al., 2016	Palha de trigo	Alcalino	NaOH	15	-	160	90	-	-
	Bagaço			NaOH (2, 5 e					
XUE et al.,	de cana-	Alcolino	NaOH e	8%)	10	30, 45 e	24, 48		
2016	de-	Aicalino	H_2O_2	H ₂ O ₂ (0, 2 e	10	60°C	e 72h	-	-
	açúcar			4%)					

2.2.3 – Hidrólises

2.2.3.1 – Hidrólise dos Materiais Amiláceos

No processo de hidrólise ou sacarificação de matérias-primas amiláceas, ocorre a transformação do amido em açúcar fermentescível, o que pode se dar por meio de hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta a vantagem de ser mais rápida e é relativamente eficiente, porém tem como desvantagens evidentes os problemas de corrosão de equipamentos e necessidade de neutralização (Sumerly et al., 2003), além da geração de resíduos poluentes e produtos que inibem a posterior fermentação, havendo também a possibilidade de degradação da glicose formada (Klinke et al., 2003).

O amido possui dois tipos de polímeros de glicose arranjados distintamente, a amilose a amilopectina. O primeiro consiste de cadeias longas não ramificadas de unidades de D-glicose unidas por ligações α (1,4). A amilopectina consiste de cadeias longas ramificadas de unidades de glicose unidas por ligações α (1,6) (Lehninger, 1995). O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos de amido dificulta a entrada de moléculas como as de água e enzimas apresentando, portanto, resistência ao processo de hidrólise (Franco et al., 2002). Neste caso, a resolução desta problemática é o emprego das enzimas alfa-amilase e beta-amilase, pois quando utilizadas conjuntamente, catalisam a hidrólise do amido, convertendo cerca de 85% em maltose e dextrina. A enzima glucoamilase converte a maltose, a dextrina e o amido restante em glicose, podendo chegar a 100% de rendimento.

De acordo com Harger (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicoseisomerases), de origem fúngica ou bacteriana. Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. As principais aplicações das enzimas extracelulares que degradam o amido consistem na conversão do amido em monossacarídeos como a glicose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas. As enzimas que degradam o amido também são empregadas na obtenção de açúcares fermentescíveis utilizados nas indústrias cervejeiras, na produção de bebidas alcoólicas, na modificação de farinhas empregadas em panificação (Ward, 1989) e para a obtenção de etanol.

De acordo com Whitaker (1994), Hizukuri (1996) e Oliveira et al. (2008), as enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação sem, no entanto, participar dela como reagente ou produto. Elas atuam ainda como reguladoras deste conjunto complexo de reações, sendo, portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular.

A ação catalítica das enzimas se faz como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução da energia de ativação da reação ou alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, as enzimas apresentam alta especificidade, que pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato. Apenas alguns resíduos aminoácidos participam diretamente da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação e posicionamento da molécula de substrato (Aquarone et al., 2001, Santana et al., 2007).

Existem poucas enzimas amilolíticas comerciais disponíveis no Brasil. Muitas são diastases usadas em processos de panificação ou em rações animais. As enzimas fornecidas pela Novozymes, Termamyl 120L que promove a liquefação do amido e a AMG 300L que sacarifica o amido são segundo Arce (2005), a dupla de enzimas que apresentaram os melhores resultados para formação de açúcar de amido.

A produção de enzimas amilolíticas por via microbiana vem sendo alvo de intensas pesquisas científicas e tecnológicas, tanto no aspecto da otimização do processo de produção, como no melhoramento genético de microrganismos para aumentar a síntese enzímica (Grael; Menezes, 1989; Lin et al., 2016).

As amilases de origem microbiana podem ser subdivididas, segundo Grael (1989) em exoamilases e endoamilases. As α -amilases fúngicas são utilizadas em panificação e em rações como auxiliar da digestão. Já a α amilase bacteriana é utilizada na liquefação do amido, na produção de xaropes, bebidas, produção de álcool, em indústria têxtil, detergentes, entre outras aplicações. As de uso industrial são termoestáveis, com atuação na faixa de 90 a 110°C e pH 6,0.

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α -1,4 e α -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (Fuji et al., 1988).

Durante a hidrólise do amido eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não-redutora da molécula do substrato. A velocidade de hidrólise depende do tipo (linear ou ramificada) e da extensão da cadeia: as ligações α -1,4 se hidrolisam mais facilmente que as ligações α -1,6, porém a maltotriose, e especialmente a maltose, hidrolisam-se mais lentamente que os oligossacarídeos (Novo, 1995).

2.2.3.2 – Hidrólise dos Materiais Lignocelulósicos

Para a hidrólise de materiais lignocelulósicos são empregadas comumente duas rotas a fim de se obter os açúcares fermentescíveis resultantes desta ação. As rotas utilizadas são a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática; alguns fatores devem ser levados em consideração no momento da escolha como, por exemplo, a composição da biomassa utilizada, o microrganismo que será usado na fermentação, assim como os custos do processo.

Hidrólise com ácido concentrado: é realizada a baixas temperaturas (< 100 °C) usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes resultando em rendimentos altos tanto de hexoses quanto de pentoses (85-90% da teoria), no entanto a principal desvantagem é a recuperação do ácido utilizado que

demanda elevados gastos de energia, além da técnica exigir o uso de equipamentos resistentes à corrosão, elevando os custos do produto final (Sakon et al., 1997; Spiridonov; Wilson, 1998; Rabelo, 2010).

A hidrólise com ácido diluído é considerada uma das técnicas mais importantes quando se deseja obter alto rendimento de açúcares de materiais lignocelulósicos. É geralmente realizado usando ácidos minerais diluídos com concentrações que variam de 0,2 a 2,5% (m/m) em temperaturas que variam de 130 a 210°C (Sarkar et al., 2012). As desvantagens são: gastos com reatores resistentes a corrosão; necessidade de neutralização do hidrolisado antes da fermentação e a formação de inibidores do processo fermentativo (Balat, 2011).

No caso da hidrólise enzimática, para a conversão da celulose em etanol primeiramente a biomassa lignocelulósica deve ser pré-tratada a fim de expor a celulose e a hemicelulose ao ataque da celulase (Ogeda; Petri, 2010; Rabelo, 2010). As principais desvantagens do processo são elevados custo da enzima e maior tempo para obter os rendimentos desejados.

2.3 – Conclusões

O presente estudo compreendeu uma investigação utilizando a batata-doce como substrato para a produção de etanol de primeira e segunda geração. Para a produção de etanol de primeira geração utilizando a raiz da batata-doce foi realizado um mapeamento das melhores condições de operação da hidrólise enzimática para em seguida ser realizado a etapa de fermentação. Já para a produção de etanol de segunda geração foram utilizadas as ramas da batata-doce e identificadas as faixas ótimas de operação para a hidrólise ácida e consequente fermentação.

CAPÍTULO 3

INVESTIGAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS RAMAS DA BATATA-DOCE

Neste Capítulo serão apresentadas a caracterização química e a hidrólise ácida empregadas nas ramas da batata-doce. A Figura 6 apresenta o Fluxograma simplificado do pré-tratamento catalisado com ácido sulfúrico sob diferentes condições de operação.



Figura 6 – Fluxograma simplificado da hidrólise ácida das ramas da batatadoce sob diferentes condições de operação.

3.1 – Caracterização química das ramas da batata-doce

3.1.1 – Introdução

A caracterização química das ramas da batata-doce permite verificar seu potencial promissor para a produção de etanol de segunda geração, pois apresenta conteúdo de celulose (46,48%) ligeiramente maior que outras biomassas, além de possuir também um conteúdo mais baixo de hemicelulose (19,28%) e lignina (19,16%) que representa uma boa característica para os materiais destinados a produção de etanol de segunda geração, pois esses dois polissacarídeos diminuem a digestibilidade da celulose em relação as celulases. A Figura 7 ilustra as ramas no campo antes da colheita.



Figura 7 – Ramas de batata-doce Fonte: Próprio autor

3.1.2 – Materiais e Métodos

3.1.2.1 – Matéria-prima

As ramas de batata-doce utilizadas neste estudo foram provenientes do Centro Tecnológico Agroindustrial e Ambiental da Universidade Federal do Tocantins, no Campus de Palmas (Palmas - Tocantins, Brasil). A cultivar industrial utilizada no experimento foi a cultivar 'Duda' com colheita manual realizada em abril/2014, esta cultivar foi registrada pela Universidade Federal do Tocantins em 15/04/2008 no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número 22598.

3.1.2.2 – Preparo da Matéria-prima e determinação do teor de umidade

As ramas obtidas após colheita foram lavadas em água corrente a fim de retirar as sujeiras vindas do campo; em seguida foram dispostas em bandejas para secagem em estufa com circulação de ar à $50 \pm 1^{\circ}$ C por 72 horas, conforme Figura 8. As ramas foram homogeneizadas em único lote e após atingirem à temperatura ambiente foram armazenadas em sacos herméticos de polietileno e apresentavam umidade média de 5,9 ± 0,2%, como mostrado na Figura 9.

O teor de umidade da biomassa foi determinado por meio de Medidor de Umidade por Infravermelho (Modelo: IV 2000, Marca: Gehaka) que tem como princípio de funcionamento o aquecimento do material exposto a temperaturas consideravelmente altas (105°C) para remoção da água através de radiação por infravermelho, esse método tem como vantagem o encurtamento do tempo requerido para a determinação da umidade. O equipamento é ligado e aquecido durante 30 minutos a fim de se estabilizar. Em seguida foi disposto aproximadamente 5 g da biomassa e por meio da variação da taxa de peso final comparada ao peso inicial foi determinada a umidade deste material. Vale ressaltar que o analisador apresenta calibragem de peso e temperatura para garantir acurácia na análise requerida, e as análises foram realizadas em triplicata.

A determinação do teor de umidade é necessária, pois está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, além de que é um fator determinante para os processos microbiológicos, como o desenvolvimento de bactérias, fungos e leveduras. Nas matérias-primas é de fundamental importância o conhecimento do teor de umidade para a conservação, armazenamento e manutenção da sua qualidade.



Figura 8 – Ramas de batata-doce prontas para secagem Fonte: Próprio autor



Figura 9 – Ramas de batata-doce secas e armazenadas em sacos herméticos Fonte: Próprio autor

Para a análise da composição química da rama, foi disposta certa quantidade em moinho analítico (Modelo: Q298A21, Marca: Quimis) e peneirado em uma peneira de 16 mesh com abertura de 0,210 mm, apropriado para análise de composição da matéria-prima.

As amostras obtidas após a moagem e separação granulométrica foram analisadas em triplicata quanto ao teor de cinzas, extrativos, lignina total (lignina solúvel + lignina insolúvel), carboidratos e grupos acetila segundo os protocolos padronizados do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory), respectivamente (Sluiter et al., 2008).

3.1.3 – Determinações analíticas

3.1.3.1 – Determinação de cinzas

O teor de cinza foi determinado baseando-se no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter et al., 2008a) como o objetivo de quantificar o material inorgânico na biomassa, estrutural ou extraível, como parte da composição total.

Para determinação do teor de cinzas da biomassa pesou-se cerca de 1,00±0,001g da biomassa em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. A análise foi realizada com a biomassa seca a 105°C previamente. A amostra foi então aquecida em forno mufla (Modelo: GP-2000F-M, Marca: GP Científica) a 400°C por 1 hora, posteriormente a temperatura foi elevada para 800°C e permaneceu neste valor por 2 horas. Após este período o cadinho foi resfriado em dessecador, sendo em seguida realizado a pesagem e posterior cálculo do conteúdo de cinzas na biomassa. As análises foram realizadas em triplicata.

Para o cálculo do teor de cinzas, tem-se:

Cinzas (%) =
$$\left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}\right) \times 100$$
 (Equação 3.1.3.1)

M₁: massa do cadinho calcinado vazio, em gramas (g)
M₂: massa do cadinho + massa da biomassa seca a 105°C, em gramas (g)
M₃: massa do cadinho com as cinzas, em gramas (g)

3.1.3.2 – Determinação dos extrativos

Os extrativos foram determinados baseando-se no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter et al., 2008b) como o objetivo de quantificar os extrativos para a caracterização química da biomassa e remover

o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos para que não haja interferência nestas etapas analíticas.

Para determinação dos extrativos foi determinado o teor de umidade das ramas como descrito no item 3.1.2.2. Adicionou-se aproximadamente 4,0 g de amostra ao cartucho de extração e introduzido no tubo de extração do Soxhlet (Marca: Tecnal, Modelo: TE-044-8/50). Adicionou-se 200 mL de água destilada no balão do extrator que foram submetidos ao aquecimento. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor. Após a extração em água, as amostras foram submetidas a extração utilizando álcool etílico e submetidas ao aquecimento. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração.

Ao término da extração, os sólidos foram transferidos e lavados com 100 mL de etanol, filtrados à vácuo e secos em estufa a 105 °C até massa constante, determinada em balança analítica.

Para o cálculo do teor de cinzas, tem-se:

% Extrativos =
$$\left(\frac{M_1 - M_2}{M_1}\right) \times 100$$
 (Equação 3.1.3.2)

M₁: massa da amostra descontado o teor de umidade, em gramas (g) M₂: massa da amostra livre de extrativos, em gramas (g)

3.1.3.3 – Determinação dos carboidratos estruturais, grupos acetil, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina

A caracterização das ramas de batata-doce foi feita com uma hidrólise em duas etapas, primeiramente foram pesados 0,300 gramas de ramas em base seca em tubos de ensaio, depois adicionados à esta matériaprima 3 mL de ácido sulfúrico com concentração de 72%. Os tubos vedados com Parafilm[®] foram então incubados em banho termostático (Marca: Solab, Modelo: SL 157) a 30°C por 1 hora e com auxílio de um bastão de vidro as amostras foram homogeneizadas em intervalos de 10 minutos. Ao término da hidrólise, todo conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para um frasco reagente de 250 mL com tampa e anel de vedação e foram adicionados 84 mL de água destilada para obter a concentração final de 4%. Posteriormente, o sistema reacional foi fechado e levado à autoclave a 121°C durante 1 hora. Depois desta hidrólise o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro qualitativo previamente tarado; uma alíquota do filtrado foi retirada para análises de carboidratos, inibidores e lignina solúvel (Sluiter et al., 2008c,d)

3.1.3.4 – Lignina Insolúvel

O resíduo retido no filtro foi neutralizado com lavagens sucessivas usando 1,5 L de água deionizada; após neutralizado o filtro foi seco em estufa a 105°C e posteriormente pesado. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado pela diferença entre o peso do resíduo insolúvel que permaneceu no papel filtro e o conteúdo de cinzas da biomassa.

Posteriormente, os materiais (sólidos retidos em papel de filtro) foram calcinados em forno mufla (Modelo: GP-2000F-M, Marca: GP Científica) a 400 °C durante 1 hora e a 800 °C por mais 2 horas. A massa obtida após cada processo foi mensurada a partir de uma balança analítica. A fração de lignina insolúvel presente nos resíduos foi calculada a partir da Equação 3.1.3.3:

Lignina insolúvel (%) =
$$\left(\frac{M_1 - M}{M_0} \times 100\right)$$
 – Cinzas II (%) (Equação 3.1.3.4)

M₁: massa do papel filtro mais lignina insolúvel após a secagem em estufa, em gramas (g)

MPFs: massa do papel filtro seco, em gramas (g)

M₀: massa inicial de amostra, em gramas (g)

Cinzas II: percentual de cinzas obtidas na calcinação dos sólidos retidos + papel filtro.

3.1.3.5 – Lignina Solúvel

Para se obter o teor de lignina solúvel foi recolhida uma amostra de 50 µL do hidrolisado do licor e adicionada a um balão volumétrico de 50 mL

completando o volume com água deionizada; foi então feita a medida em espectrofotômetro UV-visível (Modelo: DR 5000, Marca: HACH) na absorbância de 280 nm, garantindo a Lei de Beer-Lambert. A quantidade de lignina foi calculada conforme as Equações 3.1.3.5.1 e 3.1.3.5.2:

$$C_{lig}(g/L) = 4,187 \times 10^{-2}(A_T - A_{PD}) - 3,279 \times 10^{-4}$$
 (Equação 3.1.3.5.1)

onde:

Clig: concentração de lignina solúvel, em g/L;

A_T: absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;

 $A_{pd} = c1\epsilon 1 + c2 \epsilon 2 - absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-HMF), cujas concentrações c1 e c2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e <math>\epsilon 1 e \epsilon 2 são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹.$

$$Lignina \ sol\acute{u}vel \ (\%) = \left[\frac{c_{lig}(g_{/_L}) \times v_{filtrado} \times FD}{M_{biomassa \ para \ caracterização}}\right] \times 100 \qquad (Equação \ 3.1.3.5.2)$$

Onde:

V_{filtrado}: Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

FD: Fator de diluição para leitura da absorbância

M_{biomassa para caracterização}: Massa utilizada para caracterização (aproximadamente 0,3000 g).

3.1.3.6 – Quantificação de carboidratos

A análise cromatográfica dos carboidratos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de

0,6 mL/min, a 30°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 20 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 μ L da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose foram determinadas por meio de curvas de calibração obtidas por padrões analíticos. A curva foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após a injeção no cromatógrafo. Com esses resultados foi possível calcular a concentração desconhecida de açúcar dado a área obtida após a injeção no cromatógrafo. Foram preparadas soluções padrões de concentração de celobiose, glicose, xilose e arabinose.

Para o cálculo das concentrações de açúcares, temos:

$$A_{\text{c}\text{ú}\text{cares}}(\%) = \left(\frac{C_{\text{CLAE}} \times CA \times V_{\text{filtrado}}}{M_1}\right) \times 100 \quad (Equação 3.1.3.6)$$

C_{CLAE}: concentração do açúcar quantificado pro CLAE, em g/L

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a celobiose, glicose, xilose e arabinose temos, 0,95; 0,90; 0,88 e 0,88, respectivamente V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L

M₁: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em gramas (g)

3.1.3.7 – Quantificação de grupos acetila e produtos de degradação

A análise cromatográfica do ácido acético foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 30°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 20 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 μ L da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

A determinação dos produtos de degradação (5-hidroximetilfurfural e furfural) foi feita utilizando coluna Phenomenex Luna C18 5 μ (2) (250 x 4,6 mm) e pré-coluna Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm) preenchida com material semelhante a coluna principal. O fluxo do eluente foi de 1mL/min, a 30°C, com corrida de tempo total de 15 minutos. A eluição foi isocrática com uma solução de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) o detector foi UV (SPD-10A) com comprimento de onda a 276 nm.

As concentrações de ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural foram determinadas por meio de curvas de calibração obtidas por padrões analíticos. A curva foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após a injeção no cromatógrafo. Com esses resultados foi possível calcular uma concentração desconhecida de cada um dado a área obtida após a injeção no cromatógrafo. Foram preparadas soluções padrões de concentração de ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural.

Para o cálculo das concentrações de ácido acético, tem-se:

$$Acetato(\%) = \left(\frac{CA_{CLAE} \times FC \times V_{filtrado}}{M_1}\right) \times 100$$
 (Equação 3.1.3.7)

CA_{CLAE}: concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do ácido acético, 0,72

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L

M₁: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em gramas (g)
Para o cálculo das concentrações dos produtos de degradação, tem-

se:

$$Furfural(\%) = \left(\frac{CF_{CLAE} \times FC \times V_{filtrado}}{M_{1}}\right) \times 100$$
 (Equação 3.1.3.8)

CF_{CLAE}: concentração de furfural quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do ácido acético, 1,37

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L

M₁: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em gramas (g)

5 – *Hidroximetilfurfural* (%) =
$$\left(\frac{CH_{CLAE} \times FC \times V_{filtrado}}{M_1}\right)$$
 (Equação 3.1.3.9)

CH_{CLAE}: concentração de 5-hidroximetilfurfural quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do ácido acético, 1,20

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L

M₁: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em gramas (g)

3.1.4 – Resultados e Discussões

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos da composição química das ramas da batata-doce.

	Rama Batata- doce	Sorgo (Akanksha et al., 2014)	Bagaço de cana-de- açúcar (Lopes, 2016)	Palha de milho (Cheng; Timilsina, 2010)
Celulose	46,48%	39,57%	40,45%	35% a 40%
Hemicelulose	19,28%	13,63%	30,61%	17% a 35%
Lignina	19,16%	20,63%	19,09%	7% a 18%
Cinzas	6,88%	26,30%	2,48%	
Extrativos/outros	8,22%		8,96%	

Tabela 3 – Resultado da caracterização das ramas de batata-doce.

A Tabela 3 mostra que a rama de batata-doce em relação a sua composição apresenta bom potencial para produção de etanol lignocelulósico. Ela tem conteúdo de celulose ligeiramente maior 46,48% que outras biomassas, além de possuir também um conteúdo mais baixo de hemicelulose e lignina que representa uma boa característica para os materiais destinados a produção de etanol de segunda geração, pois esses dois polissacarídeos diminuem a digestibilidade da celulose em relação as celulases.

A hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos tem sido considerada um dos métodos mais rentáveis para a produção de etanol de segunda geração (Chen et al., 2012). No entanto, em virtude do uso de ácidos, esse processo possui algumas desvantagens como gastos com reatores resistentes a corrosão; necessidade de neutralização do hidrolisado antes da fermentação; formação de inibidores do processo fermentativo; necessidade de descarte correto dos sais formados na neutralização; etapa de redução de tamanho das partículas da biomassa antes do pré-tratamento a ser aplicado (Balat, 2011). Consequentemente, a concentração de ácido é um fator muito relevante, assim como o estudo da carga de sólidos e tempo de reação, sendo por este motivo, este trabalho investigou o efeito destas variáveis na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

3.2 – Hidrólise Ácida das Ramas de Batata-doce

Para montar o delineamento foi realizado previamente um estudo detalhado da hidrólise ácida desse material, visto que se fazia necessário conhecer o comportamento da biomassa em destaque. Com isso, procedeu-se a investigação da hidrólise ácida das ramas da batata-doce avaliando os efeitos da carga de sólidos, concentração de ácido sulfúrico e tempo de reação como mostrado no esquema da Figura 10. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os valores médios reportados.



Figura 10 – Esquema da Hidrólise Ácida das Ramas

Para o preparo da biomassa, determinou-se o teor médio de umidade da rama em triplicata, submetendo aproximadamente 5,0 g da amostra para análise em um Medidor de Umidade por Infravermelho (Modelo: IV 2000, Marca: Gehaka). Após a verificação do teor de umidade da rama, foi calculada a massa que foi devidamente aferida levando em consideração a carga de sólidos (10, 20 e 30%m/m) e a umidade da biomassa.

As ramas foram submetidas ao pré-tratamento químico com ácido sulfúrico diluído na concentração de 1% m/v. As soluções ácidas foram preparadas anteriormente utilizando ácido sulfúrico (Marca: Impex, Pureza: 95-97%). Os ensaios foram realizados em frascos reagentes de 500 mL (vidro de borosilicato resistente ao calor com tampas GL45), o processo de pré-tratamento foi efetuado em uma autoclave vertical (Modelo: AV Plus, Marca: Phoenix Luferco) e, após a hidrólise, os frascos foram resfriados em banho de gelo para encerrar a reação.

3.2.1 – Separação do hidrolisado

Após resfriado, o hidrolisado foi fracionado em peneira de 450 mesh com abertura de 0,025 mm. A fração líquida (licor) foi armazenada em frascos âmbar de 30 mL e refrigerada a 4°C até serem realizadas as análises. A parte sólida foi neutralizada, adicionada em béquer previamente pesado, posta para secagem em estufa a 105°C por 24 horas, e após a secagem completa os béqueres foram pesados para analisar o rendimento da hidrólise.

3.2.2 – Resultados e Discussões

A composição química das ramas da batata-doce indica que esta biomassa possui grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, pois apresenta altos conteúdos de celulose (cerca de 46%) que posteriormente podem ser convertidos em oligômeros e monômeros.

Neste intuito foi realizado um estudo detalhado dos efeitos das concentrações de ácido sulfúrico nas hidrólises ácidas levando em consideração as diferentes cargas de sólido (10, 20 e 30%m/m) e tempo reacional (15, 30, 60 e 90 minutos) na temperatura de 121°C.

3.2.2.1 – Efeito da concentração de 1 %(m/v) de ácido sulfúrico

A Tabela 3.1 apresenta as concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose) quantificados após a hidrólise ácida das ramas da batata-doce para a concentração de 1 %(m/v) de ácido sulfúrico, além de quantificar também os produtos de degradação e dos grupos acetila.

Para a carga de sólidos de 10 %(m/m), pode-se observar que as maiores concentrações foram obtidas no tempo de 15 minutos de reação com média de 40,04 g/L; de glicose em contrapartida houve incremento do produto de degradação de 1,02 g/L para o 5-hidroximetilfurfural, valores estes vindos da conversão da celulose.

Tabela 3.1 – Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose), produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido acético) na hidrólise ácida das ramas com cargas de sólido (10, 20 e 30 %m/m), tempo reacional (15, 30, 60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e concentração 1 %(m/v) de ácido sulfúrico.

Carga de sólidos (%m/m)	Tempo (min)	D-Glicose (g/L)	DL- Arabinose (g/L)	D-Xilose (g/L)	D- Celobiose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)
	15	40,0±0,2	3,1±0,0	7,6±0,2	0,8±0,0	1,0±0,1	0,2±0,0	1,0±0,0
10	30	34,2±0,3	3,6±0,0	7,5±0,2	1,3±0,0	0,9±0,0	0,4±0,0	1,2±0,0
	60	35,2±0,2	3,8±0,0	9,2±0,1	2,0±0,1	1,3±0,3	0,5±0,0	1,1±0,0
	90	36,1±0,2	4,0±0,0	9,6±0,1	2,4±0,0	1,6±0,0	0,6±0,0	1,7±0,0
	30	46,4±0,7	4,1±0,5	9,4±0,2	1,7±0,0	1,1±0,0	0,6±0,0	1,8±0,0
20	60	49,7±0,6	4,7±0,2	10,9±0,1	2,4±0,0	1,6±0,1	0,8±0,0	1,7±0,0
	90	51,6±0,4	4,9±0,3	11,8±0,2	3,0±0,0	1,8±0,1	0,8±0,1	2,7±0,0
30	60	54,8±0,8	7,1±0,1	13,8±0,1	3,6±0,3	1,7±0,0	1,0±0,1	1,7±0,3
	90	60,2±0,9	8,4±0,1	14,2±0,2	3,7±0,1	2,6±0,0	1,4±0,0	2,8±0,9

O uso de altas cargas de sólidos (superiores a 15% de sólidos) apresenta muitas vantagens, incluindo o incremento nas concentrações de açúcares e etanol além de custos de capital. Entretanto, o incremento nas cargas de sólido pode aumentar a viscosidade do meio reacional, fato ocorrido nas hidrólises com carga de sólidos de 20 %(m/m) no tempo reacional de 15 minutos e com carga de sólidos de 30 %(m/m) nos tempos de 15 e 30 minutos. Vale ressaltar que o aumento da viscosidade é um grande desafio que o manuseio com estes materiais apresentam, pois está diretamente ligado ao acréscimo de energia para a mistura tornando um fator limite no processo (Modenbach; Nokes, 2012).

Nas cargas de sólido de 20 e 30 %(m/m) houve incremento tanto nos valores de glicose (51,6 g/L e 60,2 g/L, respectivamente) quanto de xilose (11,8 g/L e 14,2 g/L, respectivamente), contudo observa-se que os produtos de degradação também tiveram seus índices elevados tornando o meio reacional tóxico para a ação de microrganismos no processo posterior de fermentação, tais valores foram obtidos no tempo de 90 minutos e na temperatura de 121 °C. A temperatura e o tempo são parâmetros que devem ser levados em consideração uma vez que afetam o desenvolvimento de inibidores.

Pode-se observar que a xilose vem da hidrólise da hemicelulose e o pré-tratamento pode favorecer a quebra da xilose até formar furfural.

Similarmente, a glicose advinda da hidrólise da celulose pode se converter a 5hidroximetilfurfural.

Nas cargas de sólido de 20 e 30 %(m/m) nos tempos de 15 e 30 minutos não se obteve sucesso na hidrólise ácida, no tocante o aumento da carga de sólidos e a baixa concentração de ácido não foi suficiente para que a biomassa convergisse os polissacarídeos em oligômeros e monômeros. No tempo reacional estudado de 15 e 30 minutos, a biomassa era hidratada com a solução de ácido sulfúrico, no entanto após o período de hidrólise formava-se uma pasta consistente dificultando a separação do material sólido do hidrolisado (licor). Na carga de sólidos de 30%m/m este comportamento foi semelhante quando se empregaram concentrações de soluções ácidas superiores (2 e 3 %m/v), reafirmando Modenbach; Nokes (2012) que afirmaram que o aumento da viscosidade é um grande desafio, pois está diretamente ligado ao acréscimo de energia para a mistura tornando um fator limite no processo.

O Quadro 2 apresenta as definições das conversões dos polímeros de hemicelulose que representa fisicamente a porcentagem total de xilose e furfural convertida a partir de hemicelulose; e a conversão da celulose que representa a porcentagem total de glicose e 5-hidroximetilfurfural convertida a partir da celulose.

	,
Definição	Cálculo
Conversão Hemicelulose	$\frac{[\text{xilose (g)} \times 0,88] + \text{furfural (g) x 1,375]}}{\text{hemicelulose na biomassa (g)}} \times 100$
Conversão Celulose	$\frac{[\text{glucose (g)} \times 0.9] + [5 - \text{HMF (g) x 1.286}]}{\text{celulose na biomassa (g)}} \times 100$

Quadro 2 – Definição das conversões dos açúcares (Chen et al., 2012).

 $C_5H_8O_4$: hemicelulose; $C_5H_{10}O_5$: xilose; $C_6H_{10}O_5$: celulose; $C_6H_{12}O_6$: glicose; $C_5H_4O_2$: furfural; $C_6H_6O_3$: 5-HMF.

0,88 = massa molar da $C_5H_8O_4$ (massa molar de $C_5H_{10}O_5$).

0,9 = massa molar da $C_6H_{10}O_5$ (massa molar de $C_6H_{12}O_6$).

1,375 = massa molar da $C_5H_8O_4$ (massa molar de $C_5H_4O_2$).

1,286 = massa molar da $C_6H_{10}O_5$ (massa molar de $C_6H_6O_3$).

Para a carga de sólidos a 10 %(m/m), a máxima conversão de celulose e hemicelulose foi de 79,20% e 65,90%, respectivamente, como mostra a Figura 11. A máxima conversão de celulose ocorreu nos primeiros 15 minutos da reação e houve pequena alteração no decorrer do estudo dos

demais tempos analisados. A máxima conversão de hemicelulose foi no tempo reacional de 90 minutos. Isso pode sugerir o desenvolvimento de um procedimento alternativo para o processo de pré-tratamento, operado de forma sequencial para melhor aproveitar as correntes minimizando a formação de inibidores, inclusive.

O comportamento da conversão da celulose no decorrer dos tempos estudados, mostra que no tempo de 30 minutos houve uma queda significativa dos teores de glicose, no entanto foi recuperada no decorrer dos minutos avaliados. No último tempo avaliado (90 minutos), vale ressaltar que a conversão ficou próxima aos valores observados no tempo de 15 minutos, no entanto a quantidade gerada de 5-HMF foi maior que nos primeiros minutos da avaliação.



Figura 11 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 10 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 1% (m/v).

Pode-se observar na Figura 12 que a máxima conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 20 %(m/m) foi de 53,06% e 38,06%, respectivamente. A máxima conversão dos dois polímeros foi no tempo de 90 minutos, no entanto quando comparado com as taxas encontradas para a carga de sólidos de 10 %(m/m) foram menores. O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 13 que indica as maiores conversões para carga de sólidos de 30 %(m/m) de 57,21% e 49,58% para celulose e hemicelulose, repectivamente.



Figura 12 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 20 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 1% (m/v).



Figura 13 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 30 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 1% (m/v).

3.2.2.2 – Efeito da concentração de 2 %(m/v) de ácido sulfúrico

A Tabela 3.2 apresenta as concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose) quantificados após a hidrólise ácida das ramas da batata-doce para a concentração de 2 %(m/v) de ácido sulfúrico, além de quantificar também os produtos de degradação e dos grupos acetila.

Tabela 3.2 – Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose), produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido acético) na hidrólise ácida das ramas com cargas de sólido (10, 20 e 30 %m/m), tempo reacional (15, 30, 60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e concentração 2 %(m/v) de ácido sulfúrico.

Carga de sólidos (%m/m)	Tempo (min)	D-Glicose (g/L)	DL- Arabinose (g/L)	D-Xilose (g/L)	D- Celobiose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)
	15	39,2±0,4	3,8±0,4	10,0±0,0	1,2±0,0	1,8±0,1	0,6±0,0	0,8±0,0
10	30	34,8±0,4	2,9±0,6	10,6±0,0	1,4±0,0	2,1±0,1	0,6±0,1	0,7±0,0
	60	40,9±0,3	2,7±0,2	11,9±0,0	2,3±0,0	2,7±0,0	0,8±0,0	0,7±0,0
	90	23,3±0,4	2,7±0,3	10,5±0,1	2,6±0,0	2,5±0,0	0,7±0,1	0,5±0,0
	15	64,6±0,6	5,9±0,0	13,9±0,2	2,4±0,1	2,1±0,0	0,8±0,1	1,8±0,0
	30	63,9±0,3	5,4±0,0	16,7±0,1	2,5±0,0	2,2±0,0	0,8±0,1	1,6±0,1
20	60	69,8±0,6	5,7±0,1	18,3±0,2	2,9±0,0	3,5±0,0	1,2±0,1	0,9±0,0
	90	37,5±0,2	5,5±0,0	19,1±0,1	3,2±0,0	4,0±0,0	1,2±0,0	0,5±0,0
20	60	83,3±0,6	7,8±0,0	20,9±0,1	4,5±0,1	3,9±0,0	1,3±0,0	1,7±0,0
30	90	99,8±0,4	7,0±0,0	22,8±0,2	5,1±0,1	4,7±0,0	1,3±0,1	2,0±0,1

As maiores concentrações dos monômeros de glicose, arabinose e xilose foram para as cargas de sólido de 30 %(m/m) apresentando teores de 99,8%, 7,8% e 22,8%, respectivamente. Em contrapartida os índices de furfural e 5-HMF também foram elevados, tornado o meio reacional nessas condições tóxico para os microrganismos na etapa posterior de fermentação.

Gámez et al. (2006) em seus estudos mostram que o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 4 %(m/m) de ácido fosfórico a 122 °C por 300 minutos obteve concentrações de xilose e glicose respectivamente, 17,6 e 3,0 g/L. Os estudos de Pattra et al. (2008) onde usaram para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar com 0,5 %(v/v) de ácido sulfúrico, 121 °C e 60 minutos obtiveram as seguintes concentrações de xilose e glicose, 11,3 e 11,9 g/L, respectivamente. Li et al. (2016) em seus estudos nas condições: carga de sólidos [10 %(m/m)], concentração de ácido sulfúrico [2 %(m/v)], tempo reacional de 60 minutos e temperatura de 121 °C, encontraram para a palha do milho aproximadamente 40% de glicose e 20% de xilose, demonstrando que os valores quantificados no presente estudo foram superiores.

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam as conversões de celulose e hemicelulose para as cargas de sólido de 10, 20 e 30 %(m/m), respectivamente. Pode-se observar que para a menor carga de sólidos estudada obteve-se no tempo reacional de 60 minutos 83,87% de conversão

de celulose e 67,03% de conversão de hemicelulose, demonstrando teoricamente rendimentos de glicose e xilose por unidade de rama superior as cargas de sólidos de 20 e 30 %(m/m) estudadas.



Figura 14 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 10 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 2% (m/v).



Figura 15 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólidos de 20 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 2% (m/v).



Figura 16 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido sde 30 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 2% (m/v).

3.2.2.3 – Efeito da concentração de 3 %(m/v) de ácido sulfúrico

Observa-se na Tabela 3.3, as concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e celobiose) quantificados após a hidrólise ácida das ramas da batata-doce para a concentração de 3 %(m/v) de ácido sulfúrico, além dos índices dos produtos gerados na degradação dos açúcares e dos grupos acetila.

Tabela 3.3 - Concentrações de carboidratos (glicose, arabinose, xilose e
celobiose), produtos de degradação (furfural e 5-HMF) e grupo acetil (ácido
acético) na hidrólise ácida das ramas com carga de sólidos (10, 20 e 30
%m/m), tempo reacional (15, 30, 60 e 90 minutos), temperatura de 121 °C e
concentração 3 %(m/v) de ácido sulfúrico.

Carga de sólidos (%m/m)	Tempo (min)	D-Glicose (g/L)	DL- Arabinose (g/L)	D-Xilose (g/L)	D- Celobiose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)
	15	32,5±0,2	3,3±0,1	10,4±0,0	1,3±0,0	2,0±0,0	0,8±0,0	0,4±0,0
10	30	53,6±0,5	3,0±0,1	11,3±0,2	1,6±0,0	2,3±0,0	0,7±0,1	0,5±0,0
	60	42,2±0,5	2,6±0,1	12,4±0,1	2,6±0,0	2,6±0,0	0,8±0,0	0,5±0,0
	90	27,8±0,2	3,0±0,1	13,6±0,1	3,0±0,0	3,3±0,0	1,0±0,0	0,4±0,0
	15	47,6±0,9	6,0±0,1	16,1±0,5	1,7±0,2	2,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,1
00	30	71,9±0,8	6,5±0,1	20,3±0,3	2,0±0,0	3,5±0,0	1,0±0,0	1,4±0,0
20	60	67,4±0,7	5,3±0,0	21,9±0,3	2,9±0,1	4,1±0,1	1,4±0,1	0,9±0,0
	90	40,6±1,0	5,5±0,3	21,5±0,2	3,3±0,0	7,2±0,1	1,5±0,1	0,5±0,0
20	60	78,8±0,2	7,0±0,1	19,9±0,1	3,0±0,2	3,6±0,0	1,4±0,0	0,9±0,1
30	90	77,0±0,3	7,3±0,0	27,0±0,2	5,4±0,1	6,0±0,0	1,8±0,0	1,3±0,1

Uma vez que o ácido sulfúrico diluído pode hidrolisar as frações de glucana e xilana da estrutura lignocelulósica, o efeito do ácido sulfúrico com maior concentração nas ramas da batata-doce pode ser mais severo. Na carga de sólido de 10 %(m/m) as maiores concentrações de glicose foram no tempo reacional de 30 minutos com teores de 53,6 g/L, no entanto o que se chama atenção foram os teores de ácido acético gerados. Para todas as cargas de sólido os teores de ácido acético são superiores a 2 g/L, tornando o meio reacional altamente inibitório a ação dos microrganismos fermentadores.

Para a carga de sólido de 20 %(m/m), os teores de glicose e xilose no tempo de 30 minutos foram de 71,9 g/L e 6,5 g/L, respectivamente. Para a carga de sólido de 30 %(m/m), os maiores índices de glicose e xilose foram 78,8 g/L e 7,3 g/L.

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as conversões de celulose e hemicelulose para os pré-tratamentos realizados com 3 %(m/v) de concentração de ácido sulfúrico. As maiores conversões tanto de celulose quanto de hemicelulose ocorreram na carga de sólido de 10 %(m/m) com valores de aproximadamente 107% e 75,8%, respectivamente. Este fato pode ser explicado que nos pré-tratamentos que se utilizam menores cargas de sólido (5-10% sólidos) apresentam altas conversões da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (Modenbach & Nokes, 2012).



Figura 17 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de 10 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 3% (m/v).



Figura 3.2.8 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de 20 %(m/m) na concentração de ácido sulfúrico de 3% (m/v).



Figura 3.2.9 – Conversão de celulose e hemicelulose para carga de sólido de 30 %(m/m).

O uso de uma maior concentração de ácido se mostrou mais severo, apresentando elevados teores de ácido acético, furfural e 5-HMF que são inibidores do processo de fermentação.

Após a realização das hidrólises ácidas e do comportamento que as ramas da batata-doce apresentaram, foi necessário estudar e otimizar a hidrólise ácida dessas ramas. Com isso, no Capítulo 4 realizado um mapeamento das condições operacionais que procuram delinear condições ótimas ou mais adequadas de operação do processo de hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

3.3 – Conclusões

As ramas da batata-doce quanto a sua composição apresentou elevados índices de celulose, componente expressivo para a produção de etanol de segunda geração, além de possuir menores teores de hemicelulose e lignina em relação a outros materiais destinados a produção de etanol lignocelulósico.

Os perfis das concentrações dos carboidratos mostram que as hidrólises ácidas das ramas de batata-doce tiveram maiores liberações nas cargas de sólido de 30 %(m/m), no entanto obtiveram também maior liberação de produtos de degradação. Nas concentrações acima de 2 %(m/v) de ácido sulfúrico notou-se uma elevação nos níveis de glicose e xilose, assim como o destaque para o tempo reacional entre 30 e 60 minutos, pois os valores obtidos nos 30 primeiros minutos de reação são muito satisfatórios quando se leva em consideração ser apenas a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

A elevação na concentração de ácido apresentou um aumento nos teores de inibidores tornado o meio reacional nessas condições tóxico para os microrganismos na etapa de fermentação.

Com isso, percebeu-se a necessidade de investigar mais detalhadamente o comportamento desta biomassa fazendo uso da técnica de planejamento de experimentos para mapear as condições de operação que favoreçam o processo, o que será apresentado no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 4

MAPEAMENTO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS RAMAS DA BATATA-DOCE UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

4.1 – Introdução

Neste Capítulo será apresentado o mapeamento das condições de operação do processo, visando a otimização da hidrólise ácida empregadas nas ramas da batata-doce utilizando a metodologia de superfície de resposta.

A partir do estudo da hidrólise ácida das ramas da batata-doce foram analisadas as melhores condições de hidrólise em termos da obtenção dos açúcares e da minimização da geração de inibidores. Para isso foram realizados novos experimentos a fim de mapear as condições operacionais que sejam mais adequadas para se atingir os objetivos, baseado nas investigações realizadas no Capítulo 3.

Foi utilizada nesta etapa a metodologia de superfície de resposta que é uma ferramenta que pode ser usada para o mapeamento e definições de condições operacionais para otimização heurística e útil que tem sido aplicada em pesquisas para identificar e avaliar o efeito de variáveis individuais e suas interações sobre as variáveis de resposta. Deve-se ressaltar que esta metodologia é considerada menos trabalhosa que a otimização formal que requer modelos matemáticos e procedimentos de solução que podem se tornar complexos, e apresenta como principais vantagens a capacidade de reduzir o número de ensaios experimentais e fornecer informações suficientes para resultados estatisticamente aceitáveis (Betiku et al., 2013). Segundo Ferreira et al. (2009), a metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística para a modelagem e otimização de múltiplas variáveis que determina as condições ótimas do processo, combinando projetos experimentais com interpolação de equações polinomiais de primeira ou segunda ordem no procedimento teste sequencial.

4.2 – Metodologia de Superfície de Resposta

Nesse experimento foram avaliados os efeitos dos fatores carga de sólidos e concentração de ácido sulfúrico na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos. O tempo reacional foi fixado em 30 minutos baseado no estudo realizado anteriormente no Capítulo 3 que demonstrou alta conversão de celulose e hemicelulose neste tempo. Para isso foi utilizado um delineamento composto central com duas repetições na parte fatorial e três repetições no ponto central. O delineamento completo é mostrado na Tabela 4.

As respostas usadas para o delineamento experimental foram as concentrações de glicose, xilose, arabinose, celobiose, furfural e 5-hidroximetilfurfural na fração líquida da hidrólise ácida (hidrolisado).

Ensaio	Carga de Sólido % (m/m)	Concentração Ácido sulfúrico %(m/v)
11 (C)	15	2,5
4	20	3,0
6	22	2,5
8	15	3,2
5	8	2,5
1	10	2,0
2	10	3,0
9 (C)	15	2,5
7	15	1,8
10 (C)	15	2,5
3	20	2,0

Tabela 4 – Variáveis do planejamento composto central na temperatura de 121 °C e tempo reacional de 30 minutos.

4.3 – Resultados e Discussões

O mapeamento para a otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce foi realizada utilizando o software Statistica 7.0. A seguir serão mostradas a análise de variância (ANOVA), as concentrações observadas e preditas de cada carboidrato (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e produtos de degradação (furfural e 5-hiodroximetilfurfural), além dos gráficos de superfície de resposta. Por meio destes resultados foi definido o melhor ponto

no delineamento investigado, considerado como aqui, o ponto ótimo da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

4.3.1 – Celobiose

A Tabela 4.1 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a celobiose. Para que um modelo seja considerado significativo e possa ser utilizado para fins preditivos, o valor de F calculado que verifica a significância da regressão deve ser maior que o tabelado. Em contrapartida, o teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor menor que o valor tabelado. Se essas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado satisfatório (Rabelo, 2010).

O modelo obtido de regressão para a celobiose demonstra baixa significância, pois atende apenas um das condições citadas anteriormente, em que o F calculado (7,27) é maior que o F tabelado (2,85). Já o teste F, onde o F calculado para a falta de ajuste apresenta valor bem superior ao valor de F tabelado, mostra falta de ajuste para o modelo. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) indicam que o modelo pode representar apenas 68,78% dos dados, e segundo Guan e Yao (2008) estes coeficientes devem ser superiores a 80% para que o modelo seja considerado bom.

celobiose na olimização da murdise acida das ramas da balala-doce.						
FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F		
Regressão	6,98	5	1,40	7,27¹		
Resíduos	3,07	16	0,19			
Falta de ajuste	2,47	3	0,82	17,86²		
Erro puro	0,60	13	0,05			
Total	9,85	21				

Tabela 4.1 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a celobiose na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

R²=68,78%

R² ajustado=59,04%

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 20 apresenta as médias dos valores observados das concentrações de celobiose em todo planejamento experimental evidenciando as cargas de sólido e as concentrações de ácido sulfúrico que foram investigadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos.



Figura 4.1 – Concentrações observadas de celobiose na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

Observa-se que o aumento da carga de sólido favorece o aumento da concentração de celobiose na hidrólise ácida das ramas, e na concentração ácida de 2,5 %(m/v) foram obtidas as maiores concentrações de celobiose (2,75 g/L).

A Tabela 4.2 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X_1 , X_2) e em um termo quadrático (X_1^2).

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	1,84	1	1,84	9,56	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X ₁ ²)	3,88	1	3,88	20,21	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	1,04	1	1,04	5,41	0,03*
Concentração de ácido %(m/v) (X_2^2)	0,22	1	0,22	1,13	0,30
X ₁ X ₂	0,00	1	0,00	0,02	0,89

Tabela 4.2 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a celobiose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de celobiose gerada durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrita pela Equação 4.3.1. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 0,64 + 0,34X_1 - 0,25X_2 + 0,59X_1^2 + 0,14X_2^2 - 0,02X_1X_2$$
(Equação 4.3.1)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de celobiose dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 21 pode-se observar que a carga de sólido possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso a partir de 20 %(m/m) de carga de sólido as concentrações de celobiose aumentam.



Gráfico de Superfície de Resposta - Celobiose (g/L)

Figura 21 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de celobiose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.3.2 – Glicose

A Tabela 4.3 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a glicose.

O modelo obtido de regressão para a glicose demonstra baixa significância, pois atende apenas um das condições para que o modelo seja considerado satisfatório, em que o F calculado (24,10) é superior ao F tabelado (2,85). Já o F calculado para a falta de ajuste (11,40) apresenta valor maior que o valor de F tabelado (3,41), mostrando assim falta de ajuste para o modelo. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 88,20% do modelo.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3164,97	5	632,99	24,10¹
Resíduos	420,15	16	26,26	
Falta de ajuste	304,46	3	101,49	11,40²
Erro puro	115,69	13	8,90	
Total	3560,73	21		
R ² =88,20%		R ² ajustado=8	4,51%	

Tabela 4.3 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a glicose na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 22 apresenta as médias dos valores observados das concentrações de glicose para as diferentes cargas de sólido e concentrações de ácido sulfúrico que foram estudadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos. A maior concentração de glicose (70,2 g/L) foi obtida na concentração de ácido sulfúrico de 3 %(m/v) e carga de sólido de 20 %(m/m). O aumento da carga de sólido e da concentração ácida favoreceu a maior liberação de glicose.



Figura 22 – Concentrações observadas de glicose na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

A Tabela 4.4 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X_1 , X_2) e na interação (X_1X_2).

Tabela 4.4 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a glicose.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	1964,21	1	1964,21	74,80	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X1²)	79,55	1	79,55	3,03	0,10
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	596,73	1	596,73	22,72	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂ ²)	38,31	1	38,31	1,46	0,24
X ₁ X ₂	486,17	1	486,17	18,51	0,00*

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de glicose gerada durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrita pela Equação 4.3.2. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 46,44 + 11,08 X_1 + 6,11 X_2 - 2,65 X_1^2 - 1,84 X_2^2 + 7,80 X_1 X_2$$
(Equação 4.3.2)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de glicose dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 23 pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a concentração de ácido sulfúrico possui maior influência sobre a concentração de glicose, de forma que nas cargas de sólido de 20 %(m/m) e na concentração de ácido de 3 %(m/v) observa-se as maiores concentrações de glicose em g/L.



Gráfico de Superfície de Resposta - Glicose (g/L)

Figura 23 - Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de glicose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.3.3 - Xilose

A Tabela 4.5 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a xilose. Analisando esta tabela é possível perceber que o modelo não pode ser usado para fins preditivos, uma vez que não satisfaz os requisitos necessários de validação dos dois testes F, em que o F calculado (66,20) é superior ao F tabelado (2,85). Já o F calculado para a falta de ajuste (5,46) apresenta valor maior que o valor de F tabelado (3,41), demonstrando assim falta de ajuste para o modelo. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 95,28%.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	272,20	5	54,44	66,20 ¹
Resíduos	13,16	16	0,82	
Falta de ajuste	7,33	3	2,44	5,46²
Erro puro	5,82	13	0,45	
Total	278,78	21		
R ² =95,28%		R ² ajustado=93	3,81%	

Tabela 4.5 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a xilose na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 24 apresenta as médias dos valores observados das concentrações de xilose em todo planejamento experimental nas distintas cargas de sólido e concentrações de ácido sulfúrico que foram usadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos.



Figura 24 – Concentrações observadas de xilose na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

As maiores concentrações de xilose são encontradas na concentração de ácido sulfúrico de 2,5 %(m/v) e 3 %(m/v) apresentando 22,1

g/L e 23,2 g/L, respectivamente. Estes resultados ocorreram nas maiores cargas de sólido estudadas 20 %(m/m) e 22 %(m/m), com isso os maiores teores de xilose foram obtidos nas maiores concentrações de ácido sulfúrico e nas maiores cargas de sólido estudadas.

A Tabela 4.6 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X₁, X₂), nos dois termos quadráticos (X₁², X₂²) e na interação (X₁X₂).

Tabela 4.6 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a xilose.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	180,76	1	180,76	219,81	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X1²)	21,60	1	21,60	26,27	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	52,75	1	52,75	64,14	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂ ²)	10,29	1	10,29	12,51	0,00*
X ₁ X ₂	6,79	1	6,79	8,26	0,01*

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de xilose gerada durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrito pela Equação 4.3.3. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 19,63 + 3,36X_1 + 1,82X_2 - 1,38X_1^2 - 0,95X_2^2 + 0,92X_1X_2$$
 (Equação 4.3.3)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de xilose dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 25 pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a concentração de ácido sulfúrico possui maior influência sobre a concentração de xilose. Assim, nas cargas de sólido de 22 %(m/m) e na concentração de ácido de 3,0 %(m/v) observa-se as maiores concentrações de xilose em g/L.



Gráfico de Superfície de Resposta - Xilose (g/L)

Figura 25 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de xilose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.3.4 – Arabinose

A Tabela 4.7 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a arabinose.

O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 130,40 que é superior ao valor tabelado (2,85), sendo assim, a equação do modelo quadrático não apresenta problemas com a regressão. Entretanto, o modelo estudado apresenta evidências de falta de ajuste, pois o F calculado (5,85) apresenta valor maior que o valor de F tabelado (3,41). Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 97,60% do modelo.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	48,98	5	9,80	130,40¹
Resíduos	1,20	16	0,07	
Falta de ajuste	0,69	3	0,23	5,85²
Erro puro	0,51	13	0,04	
Total	49,99	21		
R ² =97,60%		R² ajustado=9	6,84%	

Tabela 4.7– Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a arabinose na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 26 apresenta as médias dos valores observados das concentrações de arabinose no planejamento experimental nas cargas de sólido de 8, 10, 20 e 22 %(m/m) e nas concentrações de ácido sulfúrico 2, 2,5, 3 e 3,2 %(m/v) que foram estudadas fixadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos.



Figura 26 – Concentrações observadas de arabinose na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

Para as concentrações de arabinose obtidas o cenário foi distinto do encontrado para os demais carboidratos estudados (celobiose, glicose e xilose), pois as maiores concentrações foram notadas na concentração de ácido sulfúrico de 2 %(m/v) apresentado média de 9,2 g/L. Contudo o comportamento para as cargas de sólido se mostraram semelhantes, pois as maiores concentrações foram nas concentrações de 20 e 22 %(m/m), 9,2 g/L e 8,5 g/L, respectivamente.

Outro ponto que deve ser ressaltado é o fato da arabinose ser degradada com o aumento da concentração de ácido sulfúrico, em todos os estudos nas diferentes cargas de sólido estudadas essa situação foi semelhante como mostra a Figura 27.

A Tabela 4.8 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X₁, X₂), em um termo quadrático (X₁²) e na interação (X₁X₂).

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	44,33	1	44,33	590,07	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X1²)	0,60	1	0,60	8,03	0,01*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	2,83	1	2,83	37,74	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂ ²)	0,30	1	0,30	3,97	0,06
X ₁ X ₂	0,91	1	0,91	12,18	0,00*

Tabela 4.8 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a arabinose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de arabinose gerada durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrita pela Equação 4.3.4. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 6,94 + 1,66X_1 - 0,42X_2 - 0,23X_1^2 - 0,16X_2^2 - 0,34X_1X_2$$
(Equação 4.3.4)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de arabinose dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 27 pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a concentração de ácido sulfúrico possui maior influência sobre a concentração de arabinose, de forma que observa-se o aumento nessas concentrações à medida que as cargas de sólido e as concentrações de ácido sulfúrico se elevam.

Gráfico de Superfície de Reposta - Arabinose (g/L)



Figura 27 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de arabinose no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.3.5 – Furfural

A Tabela 4.9 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o furfural.

O modelo obtido de regressão para o furfural demonstra baixa significância, pois atende apenas um das condições para que o modelo seja considerado satisfatório, em que o F calculado (20,18) é superior ao F tabelado (2,85). Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 86,47% do modelo.

Tabela 4.9 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o furfural na otimização da hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
Regressão	0,16	5	0,03	20,18¹	
Resíduos	0,02	16	0,00		
Falta de ajuste	0,01	3	0,00	6,52²	
Erro puro	0,01	13	0,00		
Total	0,18	21			
R ² =86,47%	R ² aiustado=82.24%				

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 28 apresenta as médias dos valores observados das concentrações de furfural para as cargas de sólido e as concentrações de ácido sulfúrico que foram estudadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos.

A maior concentração foi para a carga de sólido de 22 %(m/m) de 0,4 g/L na concentração de 2,5 %(m/v) de ácido sulfúrico. Com o aumento da carga de sólido a partir de 15 %(m/m) observa-se linearmente um incremento nos teores de furfural. Vale lembrar que o furfural é um produto proveniente de uma possível degradação da xilose e da arabinose.

Entretanto, mesmo os maiores teores obtidos de furfural podem ser considerados brandos, pois não tornam o meio reacional tóxico para a posterior etapa de fermentação.



Figura 28 – Concentrações observadas de furfural na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

A Tabela 4.10 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X_1 , X_2) e em um termo quadrático (X_1^2).

Tabela 4.10 – 1	l este de significância	para cada	coeficiente d	e regressão	para o
furfural.	-				

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	0,13	1	0,13	87,70	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X1²)	0,01	1	0,01	5,50	0,03*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	0,01	1	0,01	4,92	0,04*
Concentração de ácido %(m/v) (X_2^2)	0,00	1	0,00	0,25	0,62
X ₁ X ₂	0,00	1	0,00	2,53	0,13

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de furfural gerado durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrita pela Equação 4.3.5. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 0,21 + 0,09X_1 - 0,02X_2 + 0,03X_1^2 - 0,01X_2^2 + 0,02X_1X_2$$
 (Equação 4.3.5)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de furfural dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 29 pode-se observar que a carga de sólido possui maior influência sobre a concentração de furfural, demonstrando aumento dessas concentrações nas cargas de sólido a partir de 15%(m/m).

Gráfico de Superfície de Resposta - Furfural (g/L)



Figura 29 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de furfural no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.3.6 – 5-Hidroximetilfurfural

A Tabela 4.11 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o 5-hidroximetilfurfural.

O modelo obtido de regressão para o 5-hidroximetilfurfural demonstra alta significância, pois atende as duas das condições para que o modelo seja considerado satisfatório, sendo considerado estatisticamente significativo e pode ser utilizado para fins preditivos. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 75,20% do modelo.

Tabela 4.11 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para o 5-hidroximetlfurfural na otimização da hidrólise ácida das ramas da batatadoce.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,05	5	0,01	9,59¹
Resíduos	0,02	16	0,00	
Falta de ajuste	0,00	3	0,00	0,83²
Erro puro	0,01	13	0,00	
Total	0,07	21		
R ² =75,20%		R² ajustado=6	7,45%	

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado5,16 = 2,85 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado3,13 = 3,41 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Figura 30 apresenta as médias dos valores observados nas concentrações de 5-hidroximetlfurfural detalhando as cargas de sólido e as concentrações de ácido sulfúrico que foram estudadas na temperatura de 121 °C e no tempo reacional de 30 minutos.

As maiores concentrações foram para a carga de sólido de 20 %(m/m) e a de 20 %(m/m), apresentado médias de 0,2 g/L e 0,2 g/L, respectivamente. Com o aumento na concentração de ácido sulfúrico a partir de 2,5 %(m/v) observa-se um incremento nos teores de 5-hidroximetilfurfural. O 5-hidroximetilfurfural é um produto proveniente de uma possível degradação da glicose. Contudo os valores encontrados foram baixos tornando o meio reacional favorável para o processo fermentativo.



Figura 30 – Concentrações observadas de 5-hidroximetilfurfural na hidrólise ácida das ramas da batata-doce.

A Tabela 4.12 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos dois termos lineares (X_1 , X_2) e na interação (X_1X_2).

Tabela 4.12 - Teste de signifi	cância para cada	a coeficiente de r	egressão para o
5-hidroximetilfurfural.			

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	0,01	1	0,01	11,92	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X ₁ ²)	0,00	1	0,00	1,10	0,31
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂)	0,02	1	0,02	22,91	0,00*
Concentração de ácido %(m/v) (X ₂ ²)	0,00	1	0,00	0,38	0,54
X ₁ X ₂	0,01	1	0,01	11,65	0,00*

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de 5-hidroximetilfurfural gerado durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 pode ser descrita pela Equação 4.3.6. Os valores de carga de sólidos (X₁) e concentração de ácido sulfúrico (X₂) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 0,15 + 0,03X_1 + 0,04X_2 + 0,01X_1^2 - 0,01X_2^2 + 0,04X_1X_2$$
(Equação 4.3.6)

A partir do modelo apresentado foi obtida a superfície de resposta analisando o efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de 5-hidroximetilfurfural dos hidrolisados ácidos de H₂SO₄ para as ramas da batata-doce.

Pela representação da Figura 31 pode-se observar que a interação da carga de sólido com a concentração de ácido sulfúrico possui maior influência sobre a concentração de 5-hidroximetilfurfural. Nas maiores concentrações de ácido sulfúrico, a partir de 2,0%(m/v) mostra-se a elevação dos teores do inibidor 5-hidroximetilfurfural.

Gráfico de Superfície de Resposta - 5-Hidroximetilfurfural (g/L)



Figura 31 – Efeito da carga de sólido e da concentração de ácido sulfúrico na concentração de 5-hidroximetilfurfural no hidrolisado ácido das ramas da batata-doce.

4.4 – Conclusões

Com a investigação dos efeitos das condições operacionais do processo de hidrólise ácida das ramas pode-se definir o melhor ponto na faixa considerada deste processo por meio do planejamento experimental realizado no software Statistica 7.0. O ponto considerado ótimo da hidrólise ácida das ramas foi com Carga de sólido $(X_1) = 22 \ \%(m/m)$; Concentração de ácido sulfúrico $(X_2) = 2,5 \ \%(m/v)$; Temperatura $(X_3) = 121 \ ^\circ$ C; Tempo $(X_4) = 30 \ minutos$.

Nestas condições foram obtidos as maiores médias nas concentrações de celobiose (2,75 g/L), glicose (57,01 g/L), xilose (22,07 g/L) e arabinose (8,50 g/L) além de apresentarem baixas concentrações dos produtos inibidores furfural (0,44 g/L) e 5-hidroximetilfurfural (0,23 g/L). Os inibidores que são produtos da degradação dos monossacarídeos não são desejáveis, pois apresentam influência negativa sobre os processos fermentativos. Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) revelaram que uma concentração de 1,0 g/L de 5-HMF inibiu cerca de 33% da produção de etanol, e que 0,5 g/L de furfural inibiu 22%.

Para aproveitamento integral da biomassa, no próximo Capítulo serão apresentadas as investigações referentes a utilização das raízes da batata-doce para a obtenção de etanol de primeira geração.
CAPÍTULO 5

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RAIZ DA BATATA-DOCE

5.1 – Introdução

Enquanto a cana-de-açúcar acumula seus carboidratos na forma de sacarose, dissacarídeo formado pela união de uma molécula de glicose e uma de frutose, arranjo mais vulnerável ao processo de hidrólise e consequentemente a ação de microrganismos no processo de fermentação, a batata-doce, acumula a maior parte dos seus carboidratos na forma de amido, polissacarídeo composto por cerca de 30% de amilose, uma cadeia linear de α 1-4 unidades de glicose ligada a uma estrutura helicoidal, e 70% de amilopectina, um polímero altamente ramificado com adicional α 1-6 ligações glicolíticas (Wyman & Brethauer, 2009), requerendo uma hidrólise para disponibilizar as moléculas de glicose no processo fermentativo.

O amido pode ser hidrolisado por via química (ácidos, calor e pressão) ou por via enzimática. Na hidrólise por via enzimática é necessário a associação de dois tipos de enzimas específicas (Cereda, 2001): a α-amilase, que diminui a viscosidade do meio, e a glucoamilase, que transforma o amido liquefeito em açúcares de menor massa molar (glicose).

5.2 – A batata-doce como alternativa para a produção de etanol

Na década de 70, por ocasião da implantação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), algumas fontes de matéria-prima foram testadas, como a mandioca. Por limitações no cultivo, baixa produtividade, toxicidade dos resíduos e índice de acidez elevado, ela foi abandonada e não houve prosseguimento, apesar de ter sido implantada uma destilaria com capacidade de 75.000 litros por dia. Na mesma época a batata-doce foi utilizada para suprir a entre safra da cana-de-açúcar e o processo estabelecido por pesquisadores do Instituto de Álcool e Açúcar (IAA), a partir da batata-doce foi de 150 a 158

litros de etanol por tonelada de raiz. A quantidade e a qualidade do álcool produzido tornaram evidente o potencial da cultura. Entretanto, a baixa produtividade na época (11-13 toneladas por hectare) se mostrou como um grande limitador, tornando-se inviável o processo de produção de etanol com estes baixos rendimentos.

Foi baseado nesta experiência que a equipe de pesquisadores da Universidade Federal do Tocantins – Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis – LASPER/UFT, iniciou um estudo visando desenvolver cultivares de batata-doce com características específicas para a produção de etanol. Depois de mais de dez anos de estudo, para obtenção de cultivares específicas para produção de etanol, foi estabelecido uma parceria com um grupo de empresários de Sertãozinho-SP, a fim de testar dez novas cultivares em um sistema industrial, próprio para a cultura. Após três anos de ajustes e definições de processo chegou-se a um sistema capaz de ser implantado com sucesso.

A Universidade Federal do Tocantins em parceria com a empresa AENBIO (Álcool-Energia-Nutrição-Biodiesel) desenvolveu uma tecnologia capaz de viabilizar a produção de etanol a partir da batata-doce. Além de permitir a integração econômica e social com sustentabilidade ambiental, esta tecnologia configura como alternativa para a produção de etanol a partir de fontes amiláceas. Neste contexto, o presente capítulo apresenta a otimização do processo de hidrólise enzimática no intuito de reduzir custos no processo.

5.3 – Cultivar 'Duda'

Dentre as dez cultivares lançadas pela Universidade Federal do Tocantins, foi escolhido para este trabalho a cultivar 'Duda' pelo motivo que nos últimos dez anos se destacou com o maior produtividade e rendimento de etanol.

A produtividade média obtida da cultivar 'Duda', nos últimos cinco anos, foi de 65,5 toneladas por hectare, em ciclo de 6 meses. O teor de matéria seca é e 40,4%, podendo conferir rendimentos de 161,04 litros de etanol por tonelada de raiz. Em função de sua elevada produtividade, esta cultivar é considerada a mais produtiva para a indústria, nas condições edafoclimáticas² do Tocantins, por combinar em um único genótipo, elevado teor de matéria seca e produtividade, o que resulta em produções de 10.467 litros de etanol por hectare ao ano. A Tabela 5 apresenta o comparativo dos dados de produção de etanol em função da área de cultivo de batata-doce, cana-de-açúcar e milho no tocante as suas produtividades e rendimentos de etanol.

<u>د</u>		,	
	Produtividado módia	Pondimonto do	Produção de etanol
Cultura			em função da área
	Safra 2017/18 (t/ha)	Etanol (L/t)	cultivada (L/ha)
			, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
Batata-doce	65,5	158	10.349
Cana-de-açúcar	75	82,7	6.205,7
Milho	4,8	400	1.920

Tabela 5 – Projeção da produção de etanol de batata-doce, cana-de-açúcar e milho em função da área cultivada no Estado do Tocantins, na safra 2017/18.

Fonte: Conab (2017)^a; Conab (2017)^b; Silveira (2008).

5.4 – Caracterização química das raízes

5.4.1 – Matéria-prima

As raízes de batata-doce utilizadas neste estudo foram provenientes do Centro Tecnológico Agroindustrial e Ambiental da Universidade Federal do Tocantins, no Campus de Palmas (Palmas - Tocantins, Brasil). A cultivar industrial utilizada no experimento foi a cultivar 'Duda' com colheita manual realizada em abril/2014, esta cultivar foi registrada pela Universidade Federal do Tocantins em 15/04/2008 no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número 22598.

5.4.2 – Preparo da Matéria-prima e Determinação do Teor de Umidade

As raízes após colheita foram lavadas em água corrente a fim de retirar os resíduos vindos do campo; em seguida foram fatiadas e dispostas em

² Condições edafoclimáticas: são características relativas à influência de fatores do meio como: clima, relevo, temperatura, umidade do ar, tipo de solo, precipitação pluvial entre outros.

bandejas para secagem em estufa com circulação de ar à $50 \pm 1^{\circ}$ C por 72 horas, conforme Figura 32. As fatias foram homogeneizadas em único lote e após atingirem à temperatura ambiente foram trituradas em moinho de facas com telas de 30 mesh (Modelo: Star FT 50, Marca: Fortinox). A farinha obtida foi armazenada em sacos herméticos de polietileno e apresentava umidade média de 5,4 ± 0,14%, como demonstrado na Figura 33.



Figura 32 – Raízes de batata-doce Fonte: Próprio autor

O teor de umidade da biomassa foi determinado por meio de Medidor de Umidade por Infravermelho (Modelo: IV 2000, Marca: Gehaka) que tem como princípio de funcionamento o aquecimento do material exposto a temperaturas consideravelmente altas (105°C) para remoção da água através de radiação por infravermelho. Esse método tem como vantagem o encurtamento do tempo requerido para a determinação da umidade. O equipamento é ligado e aquecido durante 30 minutos a fim de se estabilizar. Em seguida foi disposto aproximadamente 5 g da biomassa e por meio da variação da taxa de peso final comparada ao peso inicial foi determinada a umidade deste material. Vale ressaltar que o analisador apresenta calibragem de peso e temperatura para garantir acurácia na análise requerida, e as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 33 – Farinha de batata-doce Fonte: Próprio autor

A determinação do teor de umidade é necessária, pois está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, além de que é um fator determinante para os processos microbiológicos, como o desenvolvimento de bactérias, fungos e leveduras. Nas matérias-primas é de fundamental importância o conhecimento do teor de umidade para a conservação, armazenamento e manutenção da sua qualidade.

As amostras obtidas após a moagem e separação granulométrica foram analisadas em duplicata quanto ao teor de amido, cinzas, fibras totais, lipídeos e proteínas, segundo os protocolos descritos a seguir.

5.4.2.1 – Determinação do teor de amido na farinha da batata-doce

O método utilizado foi o descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), que tem como base a hidrólise do amido presente na amostra, pela ação de base e ácido, para formação de açúcares redutores. Posteriormente à hidrólise, os açúcares formados foram determinados pelo método de Lane-Eynon.

5.4.2.1.1 – Método de Lane-Eynon (também conhecido como Método de Fehling)

5.4.2.1.1.1 - Princípio

A determinação do teor de glicídios é realizada através do Método de Lane-Eynon, com utilização do Reagente de Fehling. O Método de Lane-Eynon baseia-se na redução de volume conhecido do reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que é reduzido a sua forma leuco por um pequeno excesso de açúcar redutor.

A solução de açúcar é adicionada vagarosamente de uma bureta de Fehling a uma mistura em ebulição das duas soluções de Fehling. Próximo ao ponto de viragem é adicionado 1mL de uma solução aquosa de azul de metileno 2%, que muda a cor da solução de azul para incolor no ponto de viragem. A solução fica incolor, mas como existe o precipitado cor de tijolo, a cor visível da viragem é de azul para vermelho tijolo. Existem dois fatores importantes a serem seguidos neste método para maior exatidão dos resultados:

 A solução deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação, porque o Cu₂O formado pode ser novamente oxidado pelo O₂ do ar e muda a cor novamente para azul.

 A titulação deve levar no máximo 3 minutos porque pode haver decomposição dos açúcares com o aquecimento prolongado.

5.4.2.1.1.2 – Padronização do Reagente de Fehling

1. Preparou-se a solução padrão de glicose: pesou-se 0,500g de glicose pura (seca em estufa a vácuo ou regulada a 70°C, durante 1h) e diluiu-se em 100mL num balão volumétrico.

2. Colocou-se numa bureta de Fehling a solução padrão de glicose.

Transferiu-se com pipeta volumétrica 10mL de solução Fehling A
 e 10mL de solução Fehling B para balão de titulação Fehling (balão de fundo

chato). Adicionou-se 40mL de água destilada juntamente com algumas pérolas de ebulição. Montou-se a estrutura e iniciou-se o aquecimento em bico de Bunsen.

4. Quando houve o início da fervura, começou-se a gotejar a solução-padrão até quase o final da titulação.

 Quando se iniciou o descoramento (perda da coloração azul), adicionou-se 1 gota de azul de metileno a 1% e completou-se a titulação até descoramento do indicador.

6. O tempo de titulação não ultrapassou 3 minutos. O ponto final da titulação foi em torno de 10mL de glicose.

5.4.2.1.1.3 – Cálculo do Título da Solução Fehling

O cálculo do título é feito pela equação 5.4.2.1.1.3

$$FC = \frac{V \times 0.5}{100}$$
 (Equação 5.4.2.1.1.3)

onde:

FC: Título da Solução de Fehling V: volume gasto de glicose, em mL

5.4.2.1.2 – Método de Determinação de Açúcares Redutores (Em Glicose)

5.4.2.1.2.1 – Procedimento

1. Pesou-se um grama da amostra homogeneizada em béquer de 250mL.

2. Adicionou-se 50mL de água destilada e homogeneizou-se com bastão de vidro.

3. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250mL.

4. Adicionou-se 2mL de ferrocianeto de potássio a 15% e 2mL de acetato de zinco a 30%. Agitou-se bem e completou-se o volume.

5. Aguardou-se a floculação e sedimentação do material. Filtrou-se, identificando o frasco que recebeu o filtrado.

6. Colocou-se o filtrado na bureta.

7. Pipetou-se volumetricamente 5mL de Fehling A e 5mL de FehlingB para o balão de titulação Fehling. Adicionou-se algumas pérolas de ebulição.

8. Adicionou-se 40mL de água destilada. Aqueceu-se até ebulição e gotejou-se a solução da amostra até que houve o início do descoramento. Adicionou-se 1 gota de azul de metileno a 1% e completou-se a titulação até descoramento do indicador.

9. Mantendo a ebulição, adicionou-se 1 gota de azul de metileno a
 1% e continuou-se a titulação até descoloração do indicador.

5.4.2.1.2.2 – Cálculo dos Glicídios Redutores em Glicose

O cálculo dos glicídios redutores em glicose é feito pela equação 5.4.2.1.2.2.

% Glicídios Redutores em Glicose= $\frac{FC/2 \times 250 \times 100}{V \times m}$ (Equação 5.4.2.1.2.2)

onde:

FC: título da solução de Fehling

V: volume da amostra gasto na titulação, em mL

m = massa da amostra, em g

5.4.2.1.3 – Método de Determinação de Açúcares Totais

5.4.2.1.3.1 – Procedimento

1. Pesou-se um grama da amostra homogeneizada em Erlenmeyer de 250 mL.

2. Adicionou-se 50mL de água destilada e dissolveu-se a amostra.

3. Adicionou-se 2mL de ácido clorídrico concentrado e levou-se ao banho-maria (60°C) por 60 minutos.

4. Esfriou-se e neutralizou-se com hidróxido de sódio 50%, usando papel indicador de pH.

5. Seguiram-se os procedimentos de 3 a 9 do Método açúcares redutores (Capítulo 5.4.2.1.2.1).

5.4.2.1.3.2 – Cálculo dos Glicídios Totais

O cálculo dos glicídios totais é feito pela equação 5.4.2.1.3.2

% Glicídios Totais (glicose+sacarose) = $\frac{FC/2 \times 250 \times 100}{V \times m}$ (Equação 5.4.2.1.3.2)

onde:

FC: título da solução de Fehling

V: volume da amostra gasto na titulação, em mL

M: massa da amostra, em g

5.4.2.1.3.3 – Cálculo dos Glicídios Não Redutores

O cálculo dos glicídios não redutores é feito pela equação 5.4.2.1.3.3

% Glicídios Não Redutores=(Glicídios Totais - Glicídios Redutores)×0,95

(Equação 5.4.2.1.3.3)

onde:

0,95: fator de conversão da sacarose.

5.4.2.1.4 – Método de Determinação de Amido

5.4.2.1.4.1 – Princípio

O amido não apresenta reação redutora. Uma hidrólise em meio fortemente ácido produz exclusivamente glicose, sendo determinada pelo método de Lane-Eynon.

5.4.2.1.4.2 – Procedimento

1. Pesou-se 10 g de amostra homogeneizada em Erlenmeyer de 250

mL.

2. Adicionou-se 50mL de água destilada e dissolveu a amostra.

3. Adicionou-se 10mL de ácido clorídrico concentrado (na capela).

4. O meio foi autoclavado a 121º C durante 30 min.

5. Esfriou-se e neutralizou-se com hidróxido de sódio 40%, usando papel indicador de pH.

6. Foram seguidos os procedimentos de 3 a 9 do Método açúcares redutores, colocando 4 mL de cada interferente (Capítulo 5.4.2.1.2.1).

5.4.2.1.4.3 – Cálculo do Teor de Amido

O cálculo do teor de amido é feito pela equação 5.4.2.3.4.3

% Amido=
$$\left[\left(\frac{FC_2 \times 250 \times 100}{V \times m} \right) - Accurates Totais (\%) \right] \times 0.9$$
 (Equação 5.4.2.3.4.3)

onde:

FC: título da solução de Fehling

V: volume da amostra gasto na titulação, em mL

m: massa da amostra, em g

0,9: fator de transformação de amido em glicose

5.4.2.2 – Determinação do Teor de Cinzas

Resíduo por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a (550-570°C). Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento. A determinação das cinzas na raiz da batata-doce foi baseada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

5.4.2.2.1 – Procedimento

A amostra foi então aquecida em forno mufla (Modelo: GP-2000F-M, Marca: GP Científica) a 550°C por 2 horas. Após este período o cadinho foi resfriado em dessecador, sendo em seguida realizado a pesagem e posterior cálculo do conteúdo de cinzas.

5.4.2.2.2 – Cálculo

% Cinzas=
$$\left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}\right) \times 100$$
 (Equação 5.4.2.2.2)

onde:

m₁: massa do cadinho calcinado vazio, em gramas (g)
m₂: massa do cadinho + massa da biomassa seca a 105°C, em gramas (g)
m₃: massa do cadinho com as cinzas, em gramas (g)

5.4.2.3 – Determinação do Teor de Lipídeos

5.4.2.3.1 – Procedimento

Pesou-se 2,5 g de farinha de batata-doce em papel filtro e amarrouse com fio de lã previamente desengordurado. Transferiu-se o papel de filtro amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet, previamente desengordurado e seco. O extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Foi adicionado hexano em quantidade suficiente até cobrir o reboiler (Marca: Tecnal, Modelo MA 044/8/50) a 105°C por 4 horas. Secou-se os rebolier em estufa (Marca: Nova Ética, Modelo 420-4D) a 105°C até atingir peso constante (AOAC, 1995).

5.4.2.3.2 – Cálculo

% Lipídeos=
$$\left(\frac{100 \times N}{m}\right)$$
 (Equação 5.4.2.3.1)

onde:

N: massa de lipídeos, em g

m: massa da amostra, em g

5.4.2.4 – Determinação do Teor de Proteínas

5.4.2.4.1 – Procedimento

A determinação de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl utilizando 0,5 g de amostra. Utilizou-se em cada amostra 1,5 g da mistura catalítica de sulfato de zinco e sulfato de cobre na proporção de 1/1. Adicionouse 10 mL de H₂SO₄ a 37% e colocou em um bloco digestor (Marca: Tecnal, Modelo: MA-541) a 420°C por 4 horas. Após a digestão adicionou-se 40 mL de água destilada e em um digestor de nitrogênio (Marca: Tecnal, Modelo MA-036) adicionou-se 25 mL de NaOH a 40%. Acoplado ao digestor foi colocado um Erlenmeyer de 250 mL com 15 mL de ácido bórico a 4% e 3 gotas do indicador Tashiro. Titulou-se com solução de HCI a 0,1198 N (IAL, 1985).

5.4.2.4.2 – Cálculo

% Proteínas=
$$\left(\frac{V \times 0.14 \times f}{m}\right) \times 100$$
 (Equação 5.4.2.4.2)

onde:

V: diferença entre o nº de mL de H₂SO₄ 0,05M e o nº de mL de NaOH 0,1M gastos na titulação
m: massa da amosta, em g
f: fator de conversão utilizado, no caso, foi utilizado 6,25

5.4.2.5 – Determinação do Teor de Fibra Bruta

5.4.2.5.1 – Procedimento

Para o teor de fibra bruta pesou-se 1g da amostra seca e desengordurada em papel filtro, digeridas com H_2SO_4 a 1,25% e com NaOH a 1,25% utilizando o digestor de fibras (Marca: Tecnal, Modelo MA-444/CI) a 90°C. Após a digestão as amostras foram secas em estufa a 105°C por 12 horas e pesadas. Por fim, incineradas em forno mufla a 550°C segundo os procedimentos padronizados pela Associação Oficial de Químicos Analistas (AOAC, 1995).

5.4.2.5.2 – Cálculo

% Fibra Bruta=
$$\left(\frac{100 \times N}{m}\right)$$
 (Equação 5.4.2.5.2)

onde:

N: quantidade de fibra, em g

m: massa da amostra, em g

5.4.3 – Resultados e Discussão

A Tabela 5.1 apresenta as médias dos constituintes químicos da raiz da batata-doce, cultivar 'Duda'. Segundo Gonçalves Neto et al. (2011), a batata-doce embora ainda pouco utilizada possui grande potencial para a produção de etanol, pois apresenta altos teores de amido que demonstram grande potencial para a produção de etanol. McArdle e Bouwkamp (1982), avaliaram o potencial da batata doce para a produção de etanol, utilizando cultivares de batata doce com alto teor de amido nas raízes. Os autores encontraram produtividades superiores a 5,8 t.ha⁻¹ de amido em sistema produtivo com baixa utilização de insumos agrícolas e taxa de conversão em etanol superior a 76%. Porém, em estudos recentes realizados por Masiero (2012), o genótipo BRS-Cuia apresentou 25,57% (base úmida) podendo chegar a produção estimada de etanol de 7,4 m³.ha⁻¹. Srichwong et al. (2012) em seus estudos encontraram para as cultivares K159 e DCY, 68,7% e 70,1% de teores de amido em base seca, respectivamente.

Os valores apresentados na Tabela 5.1 mostram que a cultivar 'Duda' utilizada no presente estudo apresenta alto teor de amido, média de 65,05% em base seca, comprovando assim o estudo de Antonio et al. (2011) que afirmaram que batata-doce em sua composição química deve apresentar de 50-80% de amido para ter potencial para a produção de etanol. Na mesma tabela foram demonstrados os demais constituintes da raiz da batata-doce que contém em média 2,10% de cinzas, 4,47% de fibras, 0,76% de lipídeos, 2,75% de proteínas e 24,90% de teor de umidade.

	Amostras da raiz da batata-doce				
Constituintes (%)	I	II	Média		
Amido	65,1	65,0	65,0±0,0		
Cinzas	2,1	2,1	2,1±0,0		
Fibras	4,5	4,5	4,5±0,0		
Lipídeos	0,8	0,7	0,7±0,0		
Proteínas	2,7	2,7	2,7±0,0		
Umidade	24,9	24,9	24,9±0,0		

Tabela 5.1 – Médias dos constituintes químicos da raiz da batata-doce cultivar 'Duda'.

5.5 – Hidrólise Enzimática

De acordo com Whitaker (1994), Hizukuri (1996) e Oliveira et al. (2008), as enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. A Tabela 5.2 apresenta as amilases de origem microbiana que podem ser divididas segundo Grael (1989) em exoamilases e endoamilases.

Subdivisão das	Enzimas	Atividade	Microrganismos produtores
α-amilases			
EXOAMILASES	amiloglucosidase	hidrolisa ligações	A. niger, A. awamori
		α-1,4, α-1,6 e α-1,3	A. oryzae
		levando a formação	
		de D-glucose	
	α-amilase	hidrolisa a ligação	B. cereus,
		α-1,4 formando	B.megaterium
		maltose dextrinas e	B. polymyxa, A. niger
		oligossacarídeos	A. awamori
		Menores	A. oryzae
	outras enzimas	hidrolisam ligações	Pseudomonas
	Exoativas	α-1,4, mas não	Stutzeri
		ultrapassam α-1,6	Aerobacter
		formando maltose	Aerogenes
ENDOAMILASES	β-amilase	hidrolisa ligações	B. subtilis
		α-1,4 formando	B. amyloliquefaciens
		maltose, dextrinas e	B. liquenifomis
		oligossacarídeos	
		Menores	
	pululanase e	hidrolisam ligações	Bacillus cereus
	Isoamilase	α-1,6	B. macerans
			B. amiloliquefaciens
	Enzimas	hidrolisam o amido	B. macerans
	Ciclisantes	em uma série de	
		compostos cíclicos	
		de D-glucose	

Tabela 5.2 – As amilases de origem microbiana.

Fonte: Grael, 1989.

5.5.1 – Termamyl®

Termamyl é um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de α -amilase termo-estável, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformis*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, convertendo rapidamente o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis. Termamyl foi especialmente desenvolvido para

promover a liquefação (dextrinização) do amido e produção de maltodextrinas (Oliveira et al., 2008). A enzima utilizada foi cedida pela empresa Novozymes Latin America Ltda, sediada no município de Araucária/PR.

5.5.2 - AMG 300L

A AMG é uma glucosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações α-1,4 e α-1,6 do amido liquefeito. Durante a hidrólise, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A velocidade de hidrólise depende do tipo de ligação e do comprimento da cadeia. A AMG é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose (Oliveira et al., 2008). A enzima utilizada foi cedida pela empresa Novozymes Latin America Ltda, sediada no município de Araucária/PR.

5.6 – Estudo Enzimático

O estudo da hidrólise enzimática foi realizado conforme a descrição das etapas apresentadas na Figura 34.

- As <u>raízes de Batata-doce</u> estudadas foram provenientes do Centro Tecnológico Agroindustrial e Ambiental da Universidade Federal do Tocantins, no Campus de Palmas (Palmas - Tocantins, Brasil). A cultivar industrial utilizada no experimento foi a cultivar 'Duda' com colheita manual realizada em abril/2014, esta cultivar foi registrada pela Universidade Federal do Tocantins em 15/04/2008 no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número 22598;
- Em seguida foi realizada uma <u>lavagem</u> das raízes a fim de remover as sujidades advindas do campo;
- Depois de lavadas, as raízes sofreram o processo de moagem, onde foram processados em moinho de facas com telas de 30 mesh (Modelo: Star FT 50, Marca: Fortinox);
- Na <u>farinha de batata-doce</u> obtida foi determinado o teor médio de umidade em Medidor de Umidade por Infravermelho (Modelo: IV

2000, Marca: Gehaka). Após a verificação do teor de umidade da farinha, foi calculada a massa que deveria ser aferida levando-se em consideração a carga de sólidos estudada na etapa de liquefação;

- Para cada ensaio foi realizada a pesagem da farinha de batatadoce em erlenmeyers de 250 mL (vidro de borosilicato resistente ao calor com tampas GL45).
- Foi adicionada <u>água</u> na seguinte proporção 1:3 (m/v), ou seja, para cada 1kg de farinha foi acrescido 3L de água;
- Iniciou-se o cozimento da mistura farinha e água com aquecimento gradual até atingir as temperaturas determinadas no estudo em Banho Metabólico Dubnoff (Marca: Solab, Modelo: SL 157);
- Quando a temperatura do meio atingiu 60°C foi adicionado à enzima liquidificante (Termamyl 120L). Foram avaliados os efeitos dos fatores: temperatura, carga de sólidos, dose de enzima e tempo. A etapa de liquefação será descrita com mais detalhes a seguir.
- Ao final da etapa de liquefação foram retiradas duas alíquotas de 1,5 mL para realização das análises de carboidratos, produtos de degradação e grupos acetila;
- As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore[®] de 0,22 μm e realizadas as análises de carboidratos, produtos de degradação e grupos acetila;
- O meio hidrolisado foi <u>resfriado</u> e o pH ajustado entre 4,0 e 4,5 com HCl a 2N.
- A sacarificação foi realizada adicionando-se a enzima amiloglucosidase (AMG 300L). As variáveis desta etapa serão descritas posteriormente;
- Ao final da etapa de sacarificação foram retiradas duas alíquotas de 1,5 mL para realização das análises de carboidratos, produtos de degradação e grupos acetila;

As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore[®] de 0,22 μm e realizadas as análises de carboidratos, produtos de degradação e grupos acetila.



Figura 34 – Fluxograma da Hidrólise Enzimática das Raízes da Batata-doce.

5.6.1 – Liquefação

Na etapa de liquefação das raízes da batata-doce foram avaliados os efeitos dos fatores temperatura, carga de sólidos, dose de enzima e tempo. Para isso foi utilizado um planejamento experimental com delineamento composto central com duas repetições na parte fatorial e quatro repetições no ponto central. Os experimentos foram feitos de forma aleatória.

As respostas usadas para o delineamento experimental foram as concentrações de glicose, celobiose, sacarose, frutose, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. O delineamento completo é mostrado na Tabela 5.3.

Encoio	Carga de	Dose de α-	Tomporatura (°C)	Tompo (min)
Elisaio	sólidos %(m/m)	amilase %(v/v)	Temperatura (C)	rempo (min)
9	15	0,50	75	80
4	35	0,50	95	40
21	25	0,75	65	60
20	25	1,25	85	60
3	15	0,50	95	40
5	15	1,00	75	40
16	35	1,00	95	80
22	25	0,75	105	60
24	45	0,75	85	60
17	25	0,75	85	20
2	35	0,50	75	40
25 (C)	25	0,75	85	60
15	15	1,00	95	80
28 (C)	25	0,75	85	60
11	15	0,50	95	80
27 (C)	25	0,75	85	60
12	35	0,50	95	80
10	35	0,50	75	80
23	5	0,75	85	60
7	15	1,00	95	40
6	35	1,00	75	40
14	35	1,00	75	80
26 (C)	25	0,75	85	60
13	15	1,00	75	80
18	25	0,75	85	100
8	35	1,00	95	40
19	25	0,25	85	60
1	15	0,50	75	40

Tabela 5.3 – Variáveis do planejamento composto central da Liquefação.

5.6.2 – Sacarificação

A etapa de sacarificação foi realizada a partir do ponto ótimo obtido na etapa de liquefação. Nesta etapa foram avaliados os efeitos dos fatores temperatura, dose de enzima e tempo. Para isso foi utilizado um delineamento composto central com duas repetições na parte fatorial e três repetições no ponto central. Os experimentos foram feitos de forma aleatória. As respostas usadas para o delineamento experimental foram as concentrações de glicose, celobiose, sacarose e frutose. O delineamento completo é mostrado na Tabela 5.4.

Ensaio Tempo (min)		Dose de amiloglucosidase %(v/v)	Temperatura (°C)
 2	60	0,33	60
11	60	0,75	60
18 (C)	40	1,00	70
4	60	0,75	77
14	60	0,75	43
13	80	1,00	50
7	80	0,50	50
5	80	0,50	70
6	60	0,75	60
17 (C)	60	0,75	60
16 (C)	60	1,17	60
12	40	0,50	50
1	40	1,00	50
3	80	1,00	70
8	60	0,75	60
15 (C)	94	0,75	60
10	26	0,75	60
9	60	0,33	60

Tabela 5.4 – Variáveis do planejamento composto central da Sacarificação.

5.6.3 – Quantificação de carboidratos

A análise cromatográfica dos carboidratos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 30°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 20 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 μ L da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna

Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

As concentrações de celobiose, glicose, frutose e sacarose foram determinadas por meio de curvas de calibração obtidas por padrões analíticos. A curva foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após a injeção no cromatógrafo. Com esses resultados foi possível calcular uma concentração desconhecida de açúcar dado a área obtida após a injeção no cromatógrafo. Foram preparadas soluções padrões de concentração de celobiose, glicose, frutose e sacarose.

Para o cálculo das concentrações de açúcares, tem-se:

Açúcares (%) =
$$\left(\frac{C_{CLAE} \times CA \times V_{filtrado}}{M_1}\right) \times 100$$
 (Equação 5.6.3)

onde:

C_{CLAE}: concentração do açúcar quantificado pro CLAE, em g/L

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a celobiose, glicose, frutose e sacarose temos, 0,47; 0,90; 0,90 e 0,47, respectivamente

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L

M₁: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em gramas (g)

5.6.4 – Resultados e Discussões

5.6.4.1 – Otimização da Liquefação

5.6.4.1.1 – Glicose

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da Tabela 5.5 observa-se que o valor do teste F calculado (12,64) é superior ao valor tabelado (1,95). O modelo apresenta ainda evidência de falta de ajuste, pois o valor de F calculado é 1033,87, maior que o valor tabelado 2,16. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 81,08% do modelo.

Tabela 5	5.5 – Análise	de variância	(ANOVA)	da eq	luação	de regress	são	para a
glicose n	a otimização	da etapa de	liquefação i	na hic	Irólise e	enzimática	das	raízes
da batata	a-doce.							

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	53771,40	14	3840,81	12,64¹
Resíduos	12458,83	41	303,87	
Falta de ajuste	12421,58	10	1242,16	1033,87²
Erro puro	37,24	31	1,20	
Total	65859,83	55		
R ² =81,08%		R ² ajustado=74	4,62%	

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado14,41 = 1,95 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado10,31 = 2,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.6 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos quatro termos lineares (X₁, X₂, X₃, X₄), nos quatro termos quadráticos (X₁², X₂², X₃², X₄²), e nas interações (X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄, X₂X₃, X₂X₄, X₃X₄).

Tabela 5.6 –	Teste de	significância	para	cada	coeficiente	de	regressão	para	а
concentração	de glicos	e.							

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	2228,30	1	2228,30	1854,66	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X ₁ ²)	963,67	1	963,67	802,08	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂)	8407,11	1	8407,176	6997,41	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂ ²)	36,61	1	36,61	30,47	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃)	24801,03	1	24801,03	20642,40	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃ ²)	4798,81	1	4798,81	3994,15	0,00*
Tempo (min) (X₄)	3020,70	1	3020,70	2514,19	0,00*
Tempo (min) (X ₄ ²)	336,69	1	336,69	280,23	0,00*
X ₁ X ₂	1583,32	1	1583,32	1317,83	0,00*
X ₁ X ₃	1965,46	1	1965,46	1635,89	0,00*
X ₁ X ₄	713,17	1	713,17	593,58	0,00*
X ₂ X ₃	2608,80	1	2608,80	2171,36	0,00*

		,
X ₃ X ₄ 1505,59 1 150	05,59 1253	,14 0,00*

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de glicose gerada durante a etapa de liquefação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.1. Os valores de carga de sólidos (X₁), dose de α -amilase (X₂), temperatura (X₃) e tempo (X₄) são apresentados na equação com seus valores codificados.

 $Y = 1228,28 - 11,75X_1 - 363,51X_2 - 21,45X_3 - 4,65X_4 + 2,81X_1X_2 + 0,08X_1X_3 + 0,02X_1X_4 + 3,61X_2X_3 + 1,00X_2X_4 + 0,03X_3X_4 + 0,05X_1^2 - 13,97X_2^2 + 0,10X_3^2 + 0,01X_4^2$

(Equação 5.1)

A partir do modelo apresentado foram obtidas as superfícies de resposta analisando os efeitos da carga de sólido, dose de α-amilase, temperatura e tempo na concentração de glicose dos hidrolisados enzimáticos na etapa da liquefação para as raízes da batata-doce.

Pela representação da Figura 35 que apresenta o efeito da carga de sólido e da dose de α -amilase na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a dose de α -amilase possui maior influência sobre a concentração de glicose, e com isso, o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a dose de α -amilase. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da carga de sólido 35 %(m/m) e da dose de α -amilase 1,00 %(v/v).



Figura 35 – Efeito da carga de sólidos e da dose de α-amilase na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 36 apresenta o efeito da carga de sólido e da temperatura na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce. Pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de glicose, e com isso, o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a temperatura. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da carga de sólido 35 %(m/m) e na temperatura de 95 °C.



Figura 36 – Efeito da carga de sólidos e da temperatura na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 37 apresenta o efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce. É possível observar que a interação entre a carga de sólido e o tempo possui maior influência sobre a concentração de glicose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para o tempo. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da carga de sólido 35 %(m/m) e no tempo de 80 minutos.



Figura 37 – Efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

A Figura 38 apresenta o efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce. Nota-se que a interação entre a dose de α-amilase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de glicose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de α -amilase quanto para a temperatura. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da dose de α -amilase 1,00 %(v/v) e na temperatura de 95 °C. Os valores encontrados foram superiores aos apresentados por Betiku et al. (2013) que em seus estudos com a pele que recobre as raízes da batata-doce tiveram concentrações de glicose (174,4 g/L) para a condição de 1,00 %(v/v) e 60 °C na etapa de liquefação.



Figura 38 – Efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

O efeito da dose de α -amilase e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce é mostrada na Figura 39. A interação entre a dose de α -amilase e o tempo possui maior influência sobre a concentração de glicose, e devido a isso o aumento foi linear tanto para a dose de α -amilase quanto para o tempo. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da dose de α -amilase 1,00 %(v/v) e no tempo de 80 minutos. Os valores encontrados foram superiores aos apresentados por Betiku et al. (2013) que em seus estudos com a pele que recobre as raízes da batata-doce tiveram concentrações de glicose (174,4 g/L) para a condição de 1,00 %(v/v) e 60 minutos na etapa de liquefação.



Figura 39 – Efeito da dose de α-amilase e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 40 apresenta o efeito da temperatura e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a temperatura e o tempo possui maior influência sobre a concentração de glicose, com isso o aumento foi linear tanto para a temperatura quanto para o tempo. A maior concentração de glicose (185,5 g/L) foi obtida da temperatura de 95 °C e no tempo de 80 minutos. Os valores encontrados foram superiores aos apresentados por Betiku et al. (2013) que em seus estudos com a pele que recobre as raízes da batata-doce tiveram concentrações de glicose (174,4 g/L) para a condição de 60 °C e 60 minutos na etapa de liquefação.



Figura 40 – Efeito da temperatura e do tempo na concentração de glicose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

5.6.4.1.2 - Sacarose

A Tabela 5.7 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a sacarose.

O modelo obtido de regressão para a sacarose demonstra baixa significância, pois atende apenas um das condições citadas anteriormente, em que o F calculado (18,54) é maior que o F tabelado (1,95). Já o F calculado para a falta de ajuste apresenta valor bem superior (77,74) ao valor de F tabelado (2,16), demonstrando assim falta de ajuste para o modelo. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 86,66% de forma que o modelo pode ser considerado adequado.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F		
Regressão	237,10	14	16,93	18,54¹		
Resíduos	37,46	41	0,91			
Falta de ajuste	36,02	10	3,60	77,74²		
Erro puro	1,44	31	0,05			
Total	280,84	55				
R ² =86,66%	R² ajustado=82,11%					

Tabela 5.7 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a sacarose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado14,41 = 1,95 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado10,31 = 2,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.8 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos quatro termos lineares (X₁, X₂, X₃, X₄), nos quatro termos quadráticos (X₁², X₂², X₃², X₄²), e nas interações (X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄, X₂X₄).

Tabela 5.8 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a concentração de sacarose.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	1,86	1	1,86	40,21	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X1²)	141,29	1	141,29	3049,21	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂)	1,69	1	1,69	36,51	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂ ²)	3,54	1	3,54	76,46	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃)	0,63	1	0,63	13,64	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃ ²)	0,31	1	0,31	6,74	0,01*
Tempo (min) (X ₄)	0,45	1	0,45	9,63	0,00*
Tempo (min) (X ₄ ²)	0,31	1	0,31	6,74	0,01*
X ₁ X ₂	0,58	1	0,58	12,57	0,00*
X ₁ X ₃	79,56	1	79,56	1716,94	0,00*
X ₁ X ₄	3,20	1	3,20	69,02	0,00*
X ₂ X ₃	0,02	1	0,02	0,46	0,50
X ₂ X ₄	3,51	1	3,51	75,74	0,00*
X ₃ X ₄	0,14	1	0,14	3,07	0,09

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de sacarose gerada durante a etapa de liquefação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.2. Os valores de carga de sólidos (X₁), dose de α -amilase (X₂), temperatura (X₃) e tempo (X₄) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 17,76 + 0,41X_1 + 0,43X_2 + 0,30X_3 + 0,02X_4 - 0,05X_1X_2 - 0,02X_1X_3 + 0,001X_1X_4 - 0,01X_2X_3 - 0,07X_2X_4 - 0,003X_3X_4 + 0,02X_1^2 + 4,35X_2^2 + 0,008X_3^2 + 0,002X_4^2$$

(Equação 5.2)

A partir do modelo apresentado foram obtidas as superfícies de resposta analisando os efeitos da carga de sólido, dose de α-amilase, temperatura e tempo na concentração de sacarose dos hidrolisados enzimáticos na etapa da liquefação para as raízes da batata-doce.

Pela representação da Figura 41 que apresenta o efeito da carga de sólido e da dose de α -amilase na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a dose de α -amilase possui maior influência sobre a concentração de sacarose, e assim o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a dose de α -amilase. A maior concentração de sacarose (7,9 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e da dose de α -amilase 0,75 %(v/v).



Gráfico de Superfície de Resposta - Sacarose (g/L)

Figura 41 – Efeito da carga de sólido e da dose de α-amilase na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

A Figura 42 apresenta o efeito da carga de sólido e da temperatura na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de sacarose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a temperatura. A maior concentração de sacarose (7,9 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e na temperatura de 85 °C.



Gráfico de Superfície de Resposta - Sacarose (g/L) Carga de sólidos x Temperatura

Figura 42 – Efeito da carga de sólido e da temperatura na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 43 apresenta o efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e o tempo possui maior influência sobre a concentração de sacarose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para o tempo. A maior concentração de sacarose (7,9 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e no tempo de 20 minutos.



Gráfico de Superfície de Resposta - Sacarose (g/L)

Figura 43 – Efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

A Figura 44 apresenta o efeito da dose de α -amilase e do tempo na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de αamilase e o tempo possui maior influência sobre a concentração de sacarose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de α-amilase quanto para o tempo. A maior concentração de sacarose (7,9 g/L) foi obtida da dose de αamilase 0,75 % (v/v) e no tempo de 20 minutos.



Figura 44 – Efeito da dose de α-amilase e do tempo na concentração de sacarose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

5.6.4.1.3 - Frutose

A Tabela 5.9 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a frutose. Analisando a tabela pode-se perceber que o valor de F calculado foi maior que o valor tabelado (F calculado: 8,40 e Ftabelado: 1,95), concluindo-se que a equação do modelo linear que descreve a concentração de sacarose liberada na etapa de liquefação da hidrólise enzimática da raiz da batata-doce é significativa a 95 % de confiança. O modelo ajustado apresentou evidências de falta de ajuste, pois o F calculado apresentou valor bem superior (24,05) ao valor de F tabelado (2,16). Os

valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 75,01% do modelo não sendo, portanto adequado.

Tabela 5.9 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a frutose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F		
Regressão	6756,1891	14	482,5849	8,40301		
Resíduos	2354,6455	41	57,4304			
Falta de ajuste	2085,8138	10	208,5814	24,0523 ²		
Erro puro	268,8317	31	8,6720			
Total	9421,6779	55				
R ² =75,01%	R² ajustado=66,47%					

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado14,41 = 1,95 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado10,31 = 2,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.10 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos quatro termos lineares (X₁, X₂, X₃, X₄), nos quatro termos quadráticos (X₁², X₂², X₃², X₄²), e nas interações (X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄, X₂X₃, X₃X₄).

Tabela 5.10 – Teste de significância	para	cada	coeficiente	de	regressão	para	а
concentração de frutose.							

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	3385,34	1	3385,34	390,38	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X ₁ ²)	345,82	1	345,82	39,88	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂)	614,76	1	614,76	70,89	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂ ²)	1090,47	1	1090,47	125,75	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃)	324,25	1	324,25	37,39	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃ ²)	156,37	1	156,37	18,03	0,00*
Tempo (min) (X ₄)	53,88	1	53,88	6,21	0,02*
Tempo (min) (X ₄ ²)	83,69	1	83,69	9,65	0,00*
X ₁ X ₂	208,75	1	208,75	24,07	0,00*
X ₁ X ₃	156,70	1	156,70	18,07	0,00*
X ₁ X ₄	113,42	1	113,42	13,08	0,00*
X ₂ X ₃	64,87	1	64,87	7,48	0,01*
X ₂ X ₄	5,49	1	5,49	0,63	0,43
X ₃ X ₄	152,34	1	152,34	17,57	0,00*
-----------------------------------	------------------	-----------	--------------	------------	-------
* Valores estatisticamente signif	icativos ao nívo	el de 95%	de confiança	a (p<0,05)	

O modelo obtido para a concentração de frutose gerada durante a etapa de liquefação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.3. Os valores de carga de sólidos (X₁), dose de α -amilase (X₂), temperatura (X₃) e tempo (X₄) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = -165,60 - 2,59X_1 + 49,79X_2 + 3,00X_3 + 1,55X_4 + 1,02X_1X_2 + 0,02X_1X_3 - 0,01X_1X_4 + 0,57X_2X_3 + 0,08X_2X_4 - 0,01X_3X_4 + 0,03X_1^2 - 76,26X_2^2 - 0,02X_3^2 - 0,003X_4^2$$

(Equação 5.3)

145

A partir do modelo apresentado foram obtidas as superfícies de resposta analisando os efeitos da carga de sólido, dose de α-amilase, temperatura e tempo na concentração de frutose dos hidrolisados enzimáticos na etapa da liquefação para as raízes da batata-doce.

Pela representação da Figura 45 que apresenta o efeito da carga de sólido e da dose de α -amilase na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a dose de α -amilase possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a dose de α -amilase. A maior concentração de frutose (65,6 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e da dose de α -amilase 0,75 %(v/v).



Gráfico de Superfície de Resposta - Frutose (g/L)

Figura 45 – Efeito da carga de sólido e da dose de α-amilase na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 46 apresenta o efeito da carga de sólido e da temperatura na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a temperatura. A maior concentração de frutose (65,6 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e na temperatura de 85 °C.



Figura 46 – Efeito da carga de sólidos e da temperatura na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 47 apresenta o efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e o tempo possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para o tempo. A maior concentração de frutose (65,6 g/L) foi obtida da carga de sólido 25 %(m/m) e no tempo de 100 minutos.



Gráfico de Superfície de Resposta - Frutose (g/L)



A Figura 48 apresenta o efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de α-amilase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de αamilase quanto para a temperatura. A maior concentração de frutose (65,6 g/L) foi obtida da dose de α -amilase 0,75 %(v/v) e na temperatura de 85 °C.



Gráfico de Superfície de Resposta - Frutose (g/L) Dose de α-amilase x Temperatura

Figura 48 – Efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 49 apresenta o efeito da temperatura e do tempo na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a temperatura e o tempo possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a temperatura quanto para o tempo. A maior concentração de frutose (65,6 g/L) foi obtida da temperatura de 85 °C e no tempo de 100 minutos.



Figura 49 – Efeito da temperatura e do tempo na concentração de frutose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

5.6.4.1.4 – Celobiose

Para se determinar se o modelo é estatisticamente significativo foi realizada uma análise de variância (ANOVA) como mostra a Tabela 5.11.

O modelo obtido de regressão para a celobiose demonstra baixa significância, pois atende apenas um das condições, em que o F calculado (3,6835) é maior que o F tabelado (1,95). Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 55,74% do modelo.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	55504,34	14	3964,59	3,68¹
Resíduos	44128,42	41	1076,30	
Falta de ajuste	41183,13	10	4118,31	43,35²
Erro puro	2945,29	31	95,01	
Total	99696,58	55		
R ² =55,74%		R ² ajustado=40	0,62%	

Tabela 5.11 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a celobiose na otimização da etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado14,41 = 1,95 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado10,31 = 2,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.12 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância em três termos lineares (X₁, X₂, X₃), nos quatro termos quadráticos (X₁², X₂², X₃², X₄²), e nas interações (X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄, X₂X₃, X₂X₄, X₃X₄).

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Carga de sólido %(m/m) (X ₁)	2160,70	1	2160,70	22,74	0,00*
Carga de sólido %(m/m) (X ₁ ²)	1918,50	1	1918,50	20,19	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂)	10957,87	1	10957,87	115,33	0,00*
Dose de α -amilase %(v/v) (X ₂ ²)	6628,62	1	6628,62	69,77	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃)	3899,91	1	3899,91	41,05	0,00*
Temperatura (°C) (X ₃ ²)	10873,49	1	10873,49	114,45	0,00*
Tempo (min) (X ₄)	25,20	1	25,20	0,26	0,61
Tempo (min) (X ₄ ²)	3123,63	1	3123,63	32,88	0,00*
X ₁ X ₂	1682,87	1	1682,87	17,71	0,00*
X ₁ X ₃	8647,84	1	8647,84	91,02	0,00*
X ₁ X ₄	1157,35	1	1157,35	12,18	0,00*
X ₂ X ₃	581,68	1	581,68	6,12	0,02*
X ₂ X ₄	796,71	1	796,71	8,38	0,01*
X ₃ X ₄	3049,96	1	3049,96	32,10	0,00*

Tabela 5.12 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a concentração de celobiose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de celobiose gerada durante a etapa de liquefação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.4. Os valores de carga de sólidos (X₁), dose de α -amilase (X₂), temperatura (X₃) e tempo (X₄) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 2230 - 15,46X_1 - 498,95X_2 - 34,81X_3 - 8,03X_4 + 2,90X_1X_2 + 0,16X_1X_3 + 0,03X_1X_4 + 1,71X_2X_3 + 1,00X_2X_4 + 0,05X_3X_4 - 0,06X_1^2 + 188,02X_2^2 + 0,15X_3^2 + 0,02X_4^2$$

(Equação 5.4)

A partir do modelo apresentado foram obtidas as superfícies de resposta analisando os efeitos da carga de sólido, dose de α-amilase, temperatura e tempo na concentração de celobiose dos hidrolisados enzimáticos na etapa da liquefação para as raízes da batata-doce.

Pela representação da Figura 50 que apresenta o efeito da carga de sólido e da dose de α -amilase na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a dose de α -amilase possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a dose de α -amilase. A maior concentração de celobiose (211,2 g/L) foi obtida da carga de sólido 15 %(m/m) e da dose de α -amilase 1,00 %(v/v).



Figura 50 – Efeito da carga de sólidos e da dose de α-amilase na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

A Figura 51 apresenta o efeito da carga de sólido e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para a temperatura. A maior concentração de celobiose (211,2 g/L) foi obtida da carga de sólido 15 %(m/m) e na temperatura de 75 °C. Com o aumento da carga de sólido para 35 %(m/m) e da temperatura para 95 °C houve uma quantificação de 205,6 g/L de celobiose, índices também elevados.



Figura 51 – Efeito da carga de sólidos e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 52 apresenta o efeito da carga de sólido e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a carga de sólido e o tempo possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a carga de sólido quanto para o tempo. A maior concentração de celobiose (211,2 g/L) foi obtida da carga de sólido 15 %(m/m) e no tempo de 40 minutos. Com o aumento da carga de sólidos para 35 % (m/m) e o aumento do tempo reacional para 80 minutos obteve-se 205,6 g/L de concentração de celobiose, valor também elevado.



Figura 52 – Efeito da carga de sólidos e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 53 apresenta o efeito da dose de α -amilase e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de α -amilase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de α -amilase quanto para a temperatura. A maior concentração de celobiose (211,26 g/L) foi obtida da dose de α -amilase 1,00 %(v/v) e na temperatura de 75 °C.



Figura 53 – Efeito da dose de α-amilase e da temperatura na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 54 apresenta o efeito da dose de α -amilase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de α -amilase e o tempo possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de α -amilase quanto para o tempo. A maior concentração de celobiose (211,2 g/L) foi obtida da dose de α -amilase 1,00 %(v/v) e no tempo de 40 minutos.



Figura 54 – Efeito da dose de α-amilase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batatadoce.

A Figura 55 apresenta o efeito da temperatura e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a temperatura e o tempo possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a temperatura quanto para o tempo. A maior concentração de celobiose (211,2 g/L) foi obtida da temperatura de 75 °C e no tempo de 40 minutos.



Figura 55 – Efeito da temperatura e do tempo na concentração de celobiose na etapa de liquefação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

Após o processo de otimização da etapa de liquefação verificou-se por meio do software Statistica 7.0 a região ótima em que havia a maior liberação de monossacarídeos. Com isso, foi realizado um novo planejamento experimental aplicando o estudo da sacarificação para esta região ótima definida na etapa de liquefação.

O ponto ótimo encontrado foi Carga de sólido $(X_1) = 15\%$ (m/m); Dose de α -amilase (X₂) = 0,76% (v/v); Temperatura (X₃) = 79 °C; Tempo (X₄) = 89 minutos.

5.6.4.2 – Otimização da Sacarificação

5.6.4.2.1 – Ponto Ótimo

Condições:

Ponto Ótimo: Carga de sólido (X₁) = 15 %(m/m); Dose de αamilase (X₂) = 0,76 %(v/v); Temperatura (X₃) = 79 °C; Tempo (X₄) = 89 minutos.

5.6.4.2.2 - Glicose

O modelo obtido de regressão para a glicose demonstra baixa significância, pois o F calculado (20,18) é maior que o F tabelado (2,27). Já o F calculado para a falta de ajuste apresenta valor bem superior (5,91) ao valor de F tabelado (2,68), demonstrando assim falta de ajuste para o modelo. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 87,37% do modelo, como apresentado na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a glicose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	11239,92	9	1248,88	20,18¹
Resíduos	1608,70	26	61,87	
Falta de ajuste	940,58	5	188,12	5,91²
Erro puro	668,12	21	31,81	
Total	12735,46	35		
R ² =87,37%		R ² ajustado=83	,00%	

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado9,26 = 2,27 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado5,21 = 2,68 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.14 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância em dois termos lineares (X_2, X_3) , no termo quadrático (X_2^2) e nas interações (X_1X_2, X_2X_3) .

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X ₁)	7,87	1	7,87	0,25	0,62
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X1²)	98,98	1	98,98	3,11	0,09
Temperatura (°C) (X ₂)	9371,53	1	9371,53	294,56	0,00*
Temperatura (°C) (X₂²)	615,66	1	615,66	19,35	0,00*
Tempo (min) (X ₃)	426,63	1	426,63	13,41	0,00*
Tempo (min) (X ₃ ²)	37,82	1	37,82	1,19	0,29
X ₁ X ₂	354,06	1	354,06	11,13	0,00*
X ₁ X ₃	61,44	1	61,44	1,93	0,18
X ₂ X ₃	265,91	1	265,91	8,36	0,01*

Tabela 5.14 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a concentração de glicose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de glicose gerada durante a etapa de sacarificação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.5 Os valores de dose de amiloglucosidase (X_1), temperatura (X_2) e tempo (X_3) são apresentados na equação com seus valores codificados.

 $Y = 384,23 - 181,74X_1 - 6,70X_2 - 1,69X_3 + 1,88X_1X_2 + 0,39X_1X_3 + 0,02X_2X_3 + 31,65X_1^2 + 0,05X_2^2 + 0,003X_3^2$

(Equação 5.5)

A Figura 56 apresenta o efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de amiloglucosidase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de glicose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de amiloglucosidase quanto para a temperatura. A maior concentração de glicose (172,2 g/L) foi obtida da dose de amiloglucosidase 1,00 %(v/v) e na temperatura de 70 °C.



Figura 56 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

A Figura 57 apresenta o efeito da temperatura e do tempo na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a temperatura e o tempo possui maior influência sobre a concentração de glicose, com isso o aumento foi linear tanto para a temperatura quanto para o tempo. A maior concentração de glicose (172,2 g/L) foi obtida da temperatura de 70 °C e no tempo de 80 minutos.



Figura 57 – Efeito da temperatura e do tempo na concentração de glicose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

5.6.4.2.3 - Sacarose

A Tabela 5.15 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a sacarose, observa-se que o F calculado (2,71) é maior que o F tabelado (2,27). O modelo apresenta falta de ajuste devido o F calculado apresentar valor bem superior (58,44) ao valor de F tabelado (2,68). Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 47,40% do modelo.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
Regressão	511,36	9	56,82	2,71 ¹	
Resíduos	545,84	26	20,99		
Falta de ajuste	509,25	5	101,85	58,44²	
Erro puro	36,60	21	1,74		
Total	1037,81	35			
R ² =47.40%		R ² ajustado=29	.20%		

Tabela 5.15 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a sacarose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado9,26 = 2,27 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado5,21 = 2,68 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.16 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância em um termo linear (X_1) , nos termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) e na interação (X_1X_2) .

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X_1)	70,08	1	70,08	40,21	0,00*
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X1 ²)	19,50	1	19,50	11,19	0,00*
Temperatura (°C) (X ₂)	4,95	1	4,95	2,84	0,11
Temperatura (°C) (X ₂ ²)	361,42	1	361,42	207,39	0,00*
Tempo (min) (X ₃)	0,04	1	0,04	0,02	0,88
Tempo (min) (X ₃ ²)	4,31	1	4,31	2,47	0,13
X ₁ X ₂	43,04	1	43,04	24,70	0,00*
X ₁ X ₃	6,10	1	6,10	3,50	0,07
$X_2 X_3$	1,90	1	1,90	1,09	0,31

Tabela 5.16 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a concentração de sacarose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de sacarose gerada durante a etapa de sacarificação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.6 Os valores de dose de amiloglucosidase (X₁), temperatura (X₂) e tempo (X₃) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = -92,78 - 32,11X_1 + 4,19X_2 + 0,13X_3 + 0,66X_1X_2 + 0,12X_1X_3 - 0,001X_2X_3 - 14,05X_1^2 - 0,04X_2^2 - 0,001X_3^2$$
(Equação 5.6)

A Figura 58 apresenta o efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de sacarose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de amiloglucosidase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de sacarose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de amiloglucosidase quanto para a temperatura. A maior concentração de sacarose (27,9 g/L) foi obtida da dose de amiloglucosidase 0,75 %(v/v) e na temperatura de 60 °C.

Gráfico de Superfície de Resposta - Sacarose (g/L) Dose de amiloglucosidase x Temperatura 35 30 25 20 Sacarose (glL) C 15 10 20 5 15 0 10 5 5 -10 0 -15 a to to be a set of the -5 Dose de amiloglucositase elavivi

Figura 58 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de sacarose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

5.6.4.2.4 - Frutose

A Tabela 5.17 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a frutose. O modelo obtido de regressão para a frutose demonstra baixa significância, pois atende apenas a condição de que o F calculado (17,37) é maior que o F tabelado (2,27) apresentando 95 % de confiança. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 85,46% do modelo.

Tabela 5.17 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a frutose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3503,60	9	389,29	17,37¹
Resíduos	582,82	26	22,42	
Falta de ajuste	471,62	5	94,32	17,81²
Erro puro	111,19	21	5,29	
Total	4007,82	35		
R ² =85,46%		R² ajustado=80	,42%	

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado9,26 = 2,27 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado5,21 = 2,68 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.18 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância nos termos lineares (X_1, X_2) , nos termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) e na interação (X_1X_2) .

Tabela 5.18 – Teste de significância	i para cada	coeficiente d	de regressão	para a
concentração de frutose.				

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X_1)	595,59	1	595,59	112,48	0,00*
Dose de amiloglucosidase $%(v/v)$ (X1 ²)	83,06	1	83,06	15,689	0,00*
Temperatura (°C) (X ₂)	1890,12	1	1890,12	356,97	0,00*
Temperatura (°C) (X ₂ ²)	865,23	1	865,23	163,41	0,00*
Tempo (min) (X ₃)	1,71	1	1,71	0,32	0,57

Tempo (min) (X ₃ ²)	13,95	1	13,95	2,63	0,12
X ₁ X ₂	38,83	1	38,83	7,33	0,01*
X ₁ X ₃	10,92	1	10,92	2,06	0,16
$X_2 X_3$	4,18	1	4,18	0,79	0,38

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de frutose gerada durante a etapa de sacarificação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.7. Os valores de dose de amiloglucosidase (X₁), temperatura (X₂) e tempo (X₃) são apresentados na equação com seus valores codificados.

 $Y = -152,33 + 89,64X_1 + 6,50X_2 - 0,07X_3 - 0,62X_1X_2 + 0,17X_1X_3 + 0,003X_2X_3 - 28,99X_1^2 - 0,06X_2^2 - 0,002X_3^2$ (Equação 5.7)

A Figura 59 apresenta o efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de frutose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de amiloglucosidase e a temperatura possui maior influência sobre a concentração de frutose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de amiloglucosidase quanto para a temperatura. A maior concentração de frutose (63, 7 g/L) foi obtida da dose de amiloglucosidase 1,17 %(v/v) e na temperatura de 60 °C.



Figura 59 – Efeito da dose de amiloglucosidase e da temperatura na concentração de frutose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce

5.6.4.2.5 - Celobiose

A Tabela 5.19 apresenta a análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a celobiose. O modelo obtido de regressão para a celobiose demonstra alta significância, pois atende as duas condições citadas anteriormente. Assim, o modelo encontrado é estatisticamente significativo e preditivo para a concentração de celobiose na etapa de sacarificação. Os valores encontrados para os coeficientes de determinação (R²) interpretam 53,78% do modelo.

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	57,44	9	6,38	3,381
Resíduos	49,07	26	1,89	
Falta de ajuste	13,22	5	2,6	1,55²
Erro puro	35,85	21	1,71	
Total	106,16	35		
R ² =53.78%		R ² aiustado=37	7.78%	

Tabela 5.19 – Análise de variância (ANOVA) da equação de regressão para a celobiose na otimização da etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce.

¹: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

²: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*Ftabelado9,26 = 2,27 no nível de 95% para a regressão

*Ftabelado5,21 = 2,68 no nível de 95% para a falta de ajuste

A Tabela 5.20 mostra os resultados do teste de significância para cada coeficiente de regressão. Os resultados revelam que houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de significância apenas para os termos lineares (X_1 , X_3).

FONTE DE VARIAÇÃO	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	р
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X_1)	24,97	1	24,97	14,63	0,00*
Dose de amiloglucosidase %(v/v) (X1²)	0,34	1	0,34	0,20	0,66
Temperatura (°C) (X ₂)	0,30	1	0,30	0,17	0,68
Temperatura (°C) (X ₂ ²)	0,07	1	0,07	0,04	0,84
Tempo (min) (X ₃)	22,34	1	22,34	13,08	0,00*
Tempo (min) (X ₃ ²)	4,38	1	4,38	2,56	0,12
X ₁ X ₂	3,56	1	3,56	2,09	0,16
X ₁ X ₃	0,09	1	0,09	0,05	0,82
X ₂ X ₃	1,38	1	1,38	0,81	0,38

Tabela 5.20 – Teste de significância para cada coeficiente de regressão para a concentração de celobiose.

* Valores estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)

O modelo obtido para a concentração de celobiose gerada durante a etapa de sacarificação na hidrólise enzimática pode ser descritos pela Equação 5.8. Os valores de dose de amiloglucosidase (X₁), temperatura (X₂) e tempo (X₃) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$Y = 30,82 - 18,82X_1 - 0,28X_2 - 0,27X_3 + 0,19X_1X_2 + 0,01X_1X_3 + 0,001X_2X_3 + 1,85X_1^2 + 0,005X_2^2 + 0,001X_3^2$$

(Equação 5.8)

A Figura 60 apresenta o efeito da dose de amiloglucosidase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce, pode-se observar que a interação entre a dose de amiloglucosidase e o tempo possui maior influência sobre a concentração de celobiose, com isso o aumento foi linear tanto para a dose de amiloglucosidase quanto para o tempo. A maior concentração de celobiose (9,0 g/L) foi obtida da dose de amiloglucosidase 0,50 %(v/v) e no tempo de 40 minutos.



Figura 60 – Efeito da dose de amiloglucosidase e do tempo na concentração de celobiose na etapa de sacarificação na hidrólise enzimática das raízes da batata-doce

5.7 – Conclusões

A aplicação do planejamento experimental utilizando a metodologia da superfície de resposta para o estudo da hidrólise enzimática das raízes da batata-doce obteve como ponto ótimo para a etapa da liquefação as condições de Carga de sólido: 15 %(m/m); Dose de α -amilase: 0,76 %(v/v); Temperatura: 79 °C e Tempo: 89 minutos. Para este ponto ótimo foram obtidos as concentrações para a glicose de 185,5 g/L, sacarose de 3,8 g/L, de frutose 35,1 g/L e de celobiose 205,6 g/L.

As concentrações obtidas na otimização da sacarificação do ponto I definiu o ponto ótimo da sacarificação: Dose de amiloglucosidase: 0,50 %(v/v); Temperatura: 50 °C e Tempo: 40 minutos atingindo concentrações de glicose 172,2 g/L, de sacarose 21,0 g/L, de frutose 53,6 g/L e de celobiose 9,0 g/L.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 – Conclusão Geral

As ramas da batata-doce quanto a sua composição apresentou elevados índices de celulose, componente expressivo para a produção de etanol de segunda geração, além de possuir menores teores de hemicelulose e lignina em relação a outros materiais destinados a produção de etanol lignocelulósico.

Com a investigação dos efeitos das condições operacionais do processo de hidrólise ácida das ramas pode-se definir o melhor ponto na faixa considerada deste processo por meio do planejamento experimental. O ponto considerado ótimo da hidrólise ácida das ramas foi com Carga de sólido: 22 %(m/m); Concentração de ácido sulfúrico: 2,5 %(m/v); Temperatura: 121 °C; Tempo: 30 minutos. Nestas condições foram obtidos as maiores médias nas concentrações de celobiose (2,75 g/L), glicose (57,01 g/L), xilose (22,07 g/L) e arabinose (8,50 g/L) além de apresentarem baixas concentrações dos produtos inibidores furfural (0,44 g/L) e 5-hidroximetilfurfural (0,23 g/L).

Foi possível observar a viabilidade da produção de etanol de 2G a partir do hidrolisado ácido das ramas da batata-doce, no entanto é importante ressaltar a importância de se estudar posteriormente a etapa de fermentação, além de verificar detalhadamente a ação de outros fatores que interferem diretamente nesse processo.

O estudo com as raízes da batata-doce visando a produção de etanol e a otimização das duas etapas da hidrólise enzimática, liquefação e sacarificação obteve êxito apresentando elevados teores de carboidratos, principalmente glicose. A aplicação do planejamento experimental utilizando a metodologia da superfície de resposta para o estudo da hidrólise enzimática das raízes da batata-doce obteve como ponto ótimo para a etapa da liquefação as condições de Carga de sólido: 15 %(m/m); Dose de α -amilase: 0,76 %(v/v); Temperatura: 79 °C e Tempo: 89 minutos. Para este ponto ótimo foram obtidos as concentrações para a glicose de 185,48 g/L, sacarose de 3,84 g/L, de frutose 35,06 g/L e de celobiose 205,64 g/L. As concentrações obtidas na otimização da sacarificação do ponto I definiu o ponto ótimo da sacarificação: Dose de amiloglucosidase: 0,50 %(v/v); Temperatura: 50 °C e Tempo: 40 minutos atingindo concentrações de glicose 172,22 g/L, de sacarose 21,04 g/L, de frutose 53,59 g/L e de celobiose 9,05 g/L.

Com isso foi possível observar a viabilidade da produção de etanol de 1G a partir do hidrolisado enzimático das raízes da batata-doce, no entanto é importante ressaltar a importância de se estudar detalhadamente a etapa de fermentação, além de verificar detalhadamente a ação de outros fatores que interferem diretamente nesse processo.

6.2 – Sugestões para Trabalhos Futuros

Estudar menores concentrações de soluções ácidas e menores temperaturas para a hidrólise ácida das ramas;

Estudar o processo fermentativo das ramas da batata-doce;

Estabelecer um(-) cenário(s) que integre(m) a produção de etanol de segunda geração (a partir dos açúcares fermentescíveis produzidos por meio das ramas da batata doce) e a hidrólise ácida e/ou enzimática da raiz da batata-doce, visando um processo sustentável de produção de etanol;

Estudar o uso das enzimas α-amilase e amiloglucosidase juntas nos processo fermentativo das raízes da batata-doce;

> Estudar o processo fermentativo das raízes da batata-doce.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGUNDE, O. K.; UM, T. H.; CHEN, J. W.; DENG, F. W. Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry. **Food Hydrocolloids**, n. 33, p. 169-177, 2013.

AKANKSHA, K. et al. Dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum biomass for sugar recovery — A statistical approach. **Indian Journal** of Experimental Biology, v. 52, n. November, p. 1082–1089, 2014.

AKIMKULOVA, A.; ZHOU, Y.; ZHAO, X.; LIU, D.. Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin. **Bioresource Technology**, n. 208, p. 110-116, 2016.

ALLEN, S.G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL JR.; LASER, M.; LYND, R. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.40, p.2934-2941, 2001.

ANDRADE JÚNIOR, V.C.; VIANA, D.J.S.; PINTO, N.A.V.D.; RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, R.C.; NEIVA, I.P.; AZEVEDO, A.M.; ANDRADE, P.C.R. Características produtivas e qualitativas de ramas e raízes de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, n. 30, p. 584-589, 2012.

ANTONIO, G. C., TAKEITI, C. Y., DE OLIVEIRA, R. A., PARK, K. J. Sweet potato: Production, morphological and physicochemical characteristics, and technological process. **Fruit, Vegetable and Cereal Science**, v.5, p. 1–18, 2011.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** Vol. 03. Editora Edgar Blücher Ltda. São Paulo – SP, Brasil, 2001. 595 p.

ARCE, L. S. D. **Viabilidade econômica da tiquira produzida com enzimas comerciais**. 2005. 53p. Monografia de Conclusão do Curso de Agronomia, Centro de Tecnologias para o Agronegócio, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 33. p. 10-12

BAEYENS, J., KANG, Q., APPELS, L., DEWIL, R., LV, Y., TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bioethanol. **Prog. Energ. Combust. Sci.,** n.47, p. 60–88, 2015.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BARRERA, P. **Batata-doce**: uma das doze mais importantes culturas do mundo. São Paulo: Ícone, 1986.

BETIKU, E.; AKINDOLANI, O. O.; ISMAILA, A. R. Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peel using a statistical approach. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 03, p. 467-476, 2013.

BIOEX ETANOL. Disponível em: http://www.bioexetanol.com/br/slides.html. Acesso em: 17 ago. 2010.

BNDES – BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL;CGEE– CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (Org.). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BOMTEMPO, J.V. O futuro dos biocombustíveis II: Por que a indústria de biocombustíveis do futuro será diferente da que conhecemos hoje? **Blog Infopetro** 2011.

BOSWELL, V.R. Place and season effects on yield and starch content of 38 kinds of sweet potatoes. USDA Circular 714, 1944.

CAI, D.; LI, P.; LUO, Z.; QIN, P.; CHEN, C.; WANG, Y.; WANG, Z.; TAN, T. Effect of dilute alkaline pretreatment on the conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone–butanol–ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, n. 211, p. 117–124, 2016.

CAMACHO, I.A.O. Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para a produção de bioetanol. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

CAMILI, E.A. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir da polpa de mandioca.** 2010. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Faculdade de Ciências Agronômicas.

CÁNILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da Biomassa Lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, p.48-53, 2009.

CAO, Y., TIAN, H., YAO, K., YUAN, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, n. 5 (3), p. 318-324, 2011.

CARDONA, C. A.; SÁNCHES, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2414-2457, 2007.

CARVALHO, A. M. DE et al. **Teores de Hemiceluloses, Celulose e Lignina em Plantas de Cobertura com Potencial para Sistema Plantio Direto no Cerrado.** Boletim de Pesquisas e desenvolvimento/EMBRAPA Cerrados -Planaltina - DF, p. 15, 2010.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CASTRO, I. P. M. Uso do soro de queijo na potencialização da produção convencional de etanol a partir de duas cultivares industriais de batatadoce (Ipomoea batatas (L.) Lam.). [s.l.] Universidade Federal do Tocantins, 2009.

CAVALAGLIO, G.; GELOSIA, M.; INGLES, D.; POMPILI, E.; D'ANTONIO, S.; COTANA, F.. Response surface methodology for the optimization of cellulosic

ethanol production from *Phragmites australis* through pre-saccharification and simultaneous saccharification and fermentation. **Industrial Crops and Products**, n. 83, p. 431-437, 2016.

CEREDA, M. P. **Propriedades Gerais do Amido**. São Paulo: Fundação Cargill, v.1 2002. 221 p. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latinoamericanas).

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

CHEN, C.; BOLDOR, D.; AITA, G.; WALKER, M. Ethanol production from sorghum by a microwave-assisted dilute ammonia pretreatment. **Bioresource Technology**, n. 110, p. 190-197, 2012.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1462-1466, 2008.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, J. R.; Advanced Biofuel Technologies: Status and Barriers. **Policy Research Working Paper**, set 2010. 5411, The World Bank Development Research Group Environment and Energy Team, 1-47.

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

CLARK, J.H., BUDARIN, V., DESWARTE, F.E.I., HARDY, J.J.E., KERTON, F.M., HUNT, A.J., LUQUE, R., MACQUARRIE, D.J., MILKOWSKI, K., RODRIGUEZ, A., SAMUEL, O., TAVENER, S.J., WHITE, R.J.; WILSON, A.J. Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. **Green Chemistry**, v.8, n.10, p.853-860. 2006.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 4 – safra 2017/18, n. 1 – Primeiro levantamento, abril/2017.

CONAB. Acompanhamento da safra de grãos Tocantins. Sexto levantamento, fevereiro/2017.

CORTEZ, D.V. Permeabilização de Células de Candida guilliermondii empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol. 125f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

CUI, L., LIU, C., LI, D. Changes in Volatile Compounds of Sweet Potato Tips During Fermentation. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, p. 1689-1695, 2010.

CUNHA, H.C.M.; SILVA, F.T. Identification of carbohydrates present in the hydrolysate obtained from sugar cane bagasse pretreated by steam explosion. In: 6TH BRAZ. SYMP. CHEM. LIGNINS AND OTHER WOOD COMPON., Guaratinguetá, SP, 25-28 out, 1999, p. 288-294, 2001.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661–4670, 2007.

DERMIBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: are newable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-333, 2005.

DUSSAN, K. et al. Kinetics of levulinic acid and furfural production from Miscanthus × giganteus. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 216-224, 2013.

DUVERNAY, W.H.; CHINNA, M.S.; YENCHO, G.C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops and Products**, n. 42, p. 527-537, 2013.

EBURNEO, J.A.M. **Produção de hidrolisado enzimático de farinha de batata-doce para fermentação etanólica.** 44p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2009.

FELTRAN, J.C.; VALLE, T.L. **Batata-doce** (*Ipomoea batatas* (L) Lam): matéria-prima alternativa para a produção de etanol. Disponível em: http://www.apta.sp.gov.br/cana/coletanea/batata-doce_teresa_losada.doc. Acesso em: 19 nov. 2009.

FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; LAREO, C. Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato. **Bioresource Technology**, n. 136, p. 377-384, 2013.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel from soybean: characterization and consumption in an energy generator. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 1, 2005.

FERREIRA, A. D. Utilização da levedura Pichia stipitis UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FERREIRA, S.; DUARTE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.;DOMINGUES, F. C.. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, n. 45, p. 192-200, 2009.

FRANCO, C.M.L. DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Propriedades gerais do amido.** Série Culturas Tuberosas Latino Americanas. Volume 1. Fundação Cargill, 224p., 2002.

FUJI, M.; HOMMA, T.; TANIGUCHI, M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 32, p. 910-915, 1988.

FUJITA, T.; NAKAO, E.; TAKEUCHI, M.; TANIMURA, A.; ANDO, A.; KISHINO, S.; KIKUKAWA, H.; SWHIMA, J.; OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Characterization of starch-accumulating duckweeds, *Wolffia globosa*, as renewable carbon source for bioethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 6, p. 123-127, 2016.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.59, p.618-628, 2002.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the sugarcane bagasse hydrolysis by using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, n.74, p. 78-88, 2006.

GONÇALVES NETO, A. C. et al. Correlação entre caracteres e estimação de parâmetros populacionais para batata-doce. p. 713–719, 2012.

GONÇALVES NETO, A. C. et al. Aptidões de genótipos de. batata-doce para consumo humano, produção.de etanol e alimentação animal. **Pesquisa** agropecuária Brasileira, v.46, n. 11, p.1513-1520, 2011.

GRAEL, E. T. Análise da expressão do gene de α-amilase de *B.subtilis* em bactérias recombinantes, 1989. 81p. Dissertação (Mestrado em Genética) –

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GRAEL, E. T.; MENEZES, T. J. B. Produção de α-amilase: características morfofisiológicas de *B. amyloliquefaciens* visando melhoramento genético. **Colet. Inst. Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 70-76, 1989.

GUAN, X.; YAO, H. Optimization of viscozyme Lassisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.106, 345-351 2008.

HACKENHAAR, C. Utilização do resíduo de biocombustível de batata doce (Ipomoea batatas (Lam.)) como fonte de adubação orgânica na formação de pastagens de Brachiaria CONVERT HD 364 em solos do cerrado. [s.l.] Universidade Federal do Tocantins, 2012.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v.24, n.12, p.549-556. 2006.

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

HE, M.; LI, Y.; BAI, F.; FENG, H.; ZHANG, Y. Ethanol production by mixedcultures of *Paenibacillus sp.* and *Zymomonas mobilis* using the raw starchy material from sweet potato. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 4, p.749-754, 2009.

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

HOLM-NIELSEN, J.B.; MADSEN, M.; POPIEL, P.O. World Bioenergy 2006 Conference on Biomass for Energy. Jönköping, Sweden. 2006.

IEL/NC. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central. In: **Série Indústria em Perspectiva**. Álcool Combustível/IEL Central – Brasília: IEL/NC, 2008. 163 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 4ª edição, 1020 p., 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 42-43.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012, 03 de setembro. **Produção Agrícola Municipal 2010.** Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/tabelas_pdf/tabela 02.pdf.

JEONG, H.; JANG, S.; KIM, H.; YEO, H.; CHOI, J. W.; CHOI, I.. Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. **Fuel**, n. 165, p. 145-151, 2016.

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

KAAR, W. E.; GUTIERREZ, C. V.; KINOSHITA, C. M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to etanol. **Biomass and Bioenergy**, v.14, p.277-287, 1998.

KEITT, T. E. **Sweet potato work in 1908.** North Carolina Agricultural Experimental Station.Bulletin 146.21p. 1909.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10-26, 2004.

LAREO, C.; FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; FAJARDO, L.; LARNAUDIE, V.; RAMÍREZ, M. B.; MARTÍNEZ-GARREIRO, J. Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **Springer**, v. 2, n. 493, p. 1-11, 2013.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresource. Technology, n. 81, p. 33–44, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da Bioquímica.** 2.Ed. Simões AA, Lodi WRN. São Paulo: Savier, p. 570-585, 1995.

LEMOS, E. G. M et al. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação.** Coleção PROPe Digital (UNESP), 2012.

LI, P.; CAI, D.; LUO, Z.; QIN, P.; CHEN, C.; WANG, Y.; ZHANG, C.; WHANG, Z.; TAN, T.. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. **Bioresource Technology,** n. 206, p. 86-92, 2016.

LICARI, A.; MONLAU, F.; SOHLY, A.; BUCHE, P.; BARAKAT, A. Comparison of various milling modes combined to the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Glucose yield and energy efficiency. **Energy**, n.102, p. 335-342, 2016.

LIN, L.; GUO, D.; HUANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; WEI, C. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246-254, 2016.

LIU, Z.; WU, X.; KIDA, K.; TANG, Y. Corn stover saccharification with concentrated sulfuric acid: Effects of saccharification conditions on sugar recovery and by-product generation. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 224-233, 2012.

LYND, R.L.; VAN ZYL, W.H.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-583, 2005.

LOPES, E. S. **Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído.** 2015. 210f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MA, L.J.; CUI, Y.Z.; CAI, R.; LIU, X.Q.; ZHANG, C.Y.; XIAO, D.G.. Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corn cob. **Bioresource Technology,** n. 180, p. 1–6, 2015.

MAITY, J.P., BUNDSCHUH, J.,CHEN, C.-Y., BHATTACHARYA, P. Microalgae fort third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and waste water treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, n. 78, p. 104–113, 2014.

MALUF, W. R. A batata-doce e seu o potencial na alimentação humana, na alimentação animal, e na produção de etanol biocombustível, 2014. (Nota técnica).

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEM, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enchancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Mycrobial Technology**, v. 40, p. 426-432, 2007.

MARTINIANO, S. E. Potencial fermentativo das leveduras Candida shehatae CG8-8BY e Spathaspora arborariae UFMG-HM 19.1A para a produção de etanol de segunda geração. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) -Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MARTINS, E. C. A. Variabilidade fenotípica e divergência genética em clones de batata doce no estado do Tocantins. [s.l.] Universidade Federal do Tocantins, 2010.

MASIERO, S. S. **Microusina de Batata-doce: Viabilidade econômica e técnica.** 2012. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola de Engenharia, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

McARDLE, R. N.; BOUWKAMP, J. C. Potential of sweet potato as a feedstock for small scale fuel ethanol production. **Hort science**, v.17, n.3, p.534,1982.

MILESSI, S. S. Imobilização de células de Scheffersomyces stipitis para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta. 2012 148 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

MIRANDA, J.E.C. (Coord). **A cultura da batata-doce.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças. Embrapa-SP. Brasília, 1995.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BRAUN, R. Effect of wood ash treatment on improving the fermentability of wood hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 84, n. 3, p. 390–393, 2003.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 109, p. 1430-1442, 2012.

MOHNEN, D.; BAR-PELED, M.; SOMERVILLE, C. **Cell Wall Polysaccharide Synthesis.** In: Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. Org: HIMMEL, M. E., Blackwell, 2009.

MONTANE, D.; FARRIOL, X.; SALVADO, J.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor- phase alcaline pulping of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v.14, p.261-276, 1995.

MONTEIRO, A.B. Silagens de cultivares e clones de batata-doce para alimentação animalvisando sustentabilidade da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, n. 2, p. 978-981, 2007.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

NOVO Enzyme Process Division, Fichas Técnicas, 1995, NOVO Nordisk Boidustrial do Brasil Ltda.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

ÖHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO2-impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechology**, v. 121/124, p.1055-1067, 2005.

OLIVEIRA, R.H.A.; SUDO, J.T.C.; RESENDE, M.M. Estudo dos processos de sacarificação, fermentação e destilação de cascas e pontas de mandioca no processo de obtenção de aguardente. VIII Encontro Interno e XII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

ÖNER, E.T.; OLIVER, S.T.; KIRDAR, B. Production of Ethanol from Starch by Respiration-Deficient Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p.6443-6445, 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum. **International Journal of Hydrogen** Energy, n. 33, p. 5256-5265, 2008.

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

PEDUZZI, P. Pará poderia liderar produção de álcool e mandioca. **Diário do Pará.** Disponível em: http://ethanolbrasil.blogspot.com/2009/02/para-poderia-liderar-produção-de-alcool.html> Acesso em: 25 de out de 2009.

PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.834-840, 2009.

PUPPAN, D. Environmental evaluation of biofuels. **Periodica Polytechnica Ser. Soc. Man. Sci.,** v. 10, p. 95-116, 2002.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 447p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAGAUSKAS, A.J., WILLIAMS, C. K., DAVISON, B.H. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, n. 311, p.484-489, 2006.

ROCHA, G.J.M.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C.; GONÇALVES, A.R.; NASCIMENTO, V.M.; SOUTO-MAIOR, A.M. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. **Sugar Tech**, v. 15, n. 4, p. 390-398, 2013.

ROSA, S. E. S.; GARCIA. J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n° 32, dezembro 2009.

SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.76, p.65-77, 1999.

SAKON J., IRWIN D., WILSON D. B., KARPLUS P. A. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora* fusca. **Nat. Struct. Biol.**, n. 4, p. 810–818, 1997.

SANTANA, N. B. Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
SANTANA, W.R.; MARTINS, L.P.; SILVEIRA, M.A.; SANTOS, W.F.; GONÇALVES, R.C.; SOUZA, F.R.; RESPLANDES, G.R.S.; LIMA, M.M. Identificação agronômica de genótipos de batata-doce em banco de germoplasma para fins industriais de etanol carburante. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 7, n. 1, p. 31-34, 2013.

SANTOS, Fernando. **Bioenergia e Biorefinaria: Cana de açúcar & Espécies Florestais.** UFV: Viçosa, 2013.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SCHELL, D.J., FARMER, J., NEWMAN, M., MCMILLAN, J.D. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105, n. 108, 69–85, 2003.

SCHELL D.J., WALTER P.J., JOHNSON D.K. Dilute sulphuric-acid pretreatment of corn stover at high solids concentration—scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34, n. 35, p. 659–65, 1992.

SILVA, A. S.; TEIXEIRA, R. S. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BARROS, R. R. O.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S. **Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production.** In: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization Org: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S., InTech, 2013.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. A cultura da batata-doce. In: CEREDA, M. P. (org.). **Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, 2002. cap. 22, p. 448 – 457.

SILVA, M.A.; MELO E SOUZA, R.; SOUZA, R.R. **Biodegradação de resíduos agrícolas como alternativa à redução de riscos ambientais no semi-árido sergipano.** In: II Encontro ANPPAS. São Paulo, SP, 26 a 29 de maio de 2004. Disponível em: <www.anppas.org.br/encontro_anual/.../silva_ma_e_outros.pdf> Acesso em: 15 out. 2010.

SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) –

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2009. SILVEIRA, L.R.; CHIESA, V.B.; TAVARES, I.B.; SOUZA, R.C.; SILVEIRA, M.A.; ALVES, D.G.; OLIVEIRA JUNIOR, W.P.. Caracterização físico-química e clones de batata-doce de polpa alaranjada nas condições de Palmas-TO. **Estudos**, v. 38, n. 2, p. 365-380, 2011.

SILVEIRA, M.A. A cultura da batata – doce como fonte de matéria prima para produção de etanol. Boletim Técnico – UFT p.21. 2008.

SILVEIRA, M.A.; DIAS, L.E.; ALVIM, T.C. **A cultura de bata-doce como fonte de matéria prima para etano**l. Boletim Técnico. LASPER – UFT, 2008. Palmas-TO.

SILVEIRA, M. A. **A Cultura da Batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol.** Boletim Técnico. 2007. Universidade Federal do Tocantins/LASPER. Palmas-TO.

SLUITER, A.; HAMER, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**, Laboratory Analytical Procedure, NREL, Report nº TP-510-42622, 1-8, 2008a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass**, Laboratory Analytical Procedure, NREL, Report nº TP-510-42619, 1-12, 2008b.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**, Laboratory Analytical Procedure, NREL, Report No. TP-510-42618, 1-18, 2008c.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples, Laboratory Analytical Procedure, NREL, Report No. TP-510-42623, 1-14, 2008d.

SOUZA, A.F.B.C. Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce *(Ipomoea batatas* (L.) Lam) por meio de células imobilizadas para produção de etanol. 2005. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D. B. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. **Journal Bacteriol.**, n. 180, p. 3529-3532, 1998.

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

SUMERLY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Hidrólise de amido. In: CEREDA et al. (Coord). **Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap. 15; Fundação Cargill, p. 337-448, 2003.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, n.199, p. 49-58, 2016.

SUN, Z.; TANG, Y.; MORIMURA, S. KIDA, K. Reduction in environmental impact of sulfuric acid hydrolysis of bamboo for production of fuel ethanol. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 87-93, 2013.

TERAMURA, H.; OSHIMA, T.; MATSUDA, F.; SASAKI, K.; OGINO, C.; YAMASAKI, M.; KONDO, A. Glucose content in the liquid hydrolysate after dilute acid pretreatment is affected by the starch content in rice straw. **Bioresource Technology**, n. 149, p. 520–524, 2013.

TIMUNG, R. et al. Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 9–18, 2015.

TOVAR L.P., MACIEL M.R.W., FILHO R.M. Plug flow reactor model to analyse operating conditions on the dilute H₂SO₄-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at high-solids loading, **Chemical Engineering Transactions**, 37, 325-300, 2014.

UNEP. Towards sustainable production and use of ressources: Assessing **Biofuels:** United Nations Environment Programmed. 2009. 120 p.

USDA. "Bioenergy, US Department of Agriculture, Office of Energy Policy and New Uses". Apresentação feita na "Renewable Resources and Biorefineries Conference", York, UK, set. 6-8, 2006.

VARGAS, G.; DOMÍNGUEZ, E.; VILA, C.; RODRÍGUEZ, A.; GARROTE, G.. Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. **Bioresource Technology**, n. 191, p. 263–270, 2015. WALUYO, B.; ROOSDA, A. A.; ISTIFADAH, N.; RUSWANDI, D.; KARUNIAWAN, A. Identification of Fifty Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Promising Clones for Bioethanol Raw Materials. **Energy Procedia**, n. 65, p. 22-28, 2015.

WANG, M., SHI, Y., XIA, X., LI, D., CHEN, Q. Life-cycle energy efficiency and environmental impacts of bioethanol production from sweet potato. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 285–292, 2013.

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

WAYMAN M, PAREKH SR. SO₂ prehydrolysis for high-yield ethanol-production from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p.33–43, 1988.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second** Ed., pp. 271-556, Marcel Dekker, New York, 1994.

WYMAN, C.E.; BRETHAUER, S. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, United States, v. 101, n.13, p.4862-4874, 2009.

XIAO, W. et al. The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2019–2023, 2012.

XUE, J. L.; ZHAO, S.; LIANG, R. M.; YIN, X.; JIANG, S. X.; SU, L. H.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, n. 204, p. 130–138, 2016. YANG, H.; XIE, Y.; ZHENG, X.; PU, Y.; HUANG, F.; MENG, X.; WU, W.; RAGAUSKAS, A.; YAO, L. Comparative study of lignin characteristics from wheat straw obtained by soda-AQ and kraft pretreatment and effect on the following enzymatic hydrolysis process. **Bioresource Technology**, n. 204, p.

361–369, 2016.

YANG, L.; CAO, J.; MAO, J.; JIN, Y.. Sodium carbonate-sodium sulfite pretreatment for improving the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Industrial Crops and Products** n. 43, p. 711–717, 2013.

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

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN, M.; JIN, Y.; GAO, X.; CHEN, Q.; GUAN, J.; WANG, Z. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 4573-4579, 2011.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465–482, 2012.

ZHU, F.; WANG, S. Physicochemical properties, molecular structure, and uses of sweet potato starch. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 68-78, 2014.

ZISKA, L.H., RUNION, G.B., TOMECEK, M., PRIOR, S.A., TORBET, H.A., SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential

carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. **Biomass and Bioenergy,** v.33, n. 11, p.1503–1508, 2009.