



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**APROVEITAMENTO DO FARELO RESIDUAL DO PROCESSAMENTO DE  
FÉCULA DE MANDIOCA NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**FERNANDA DE OLIVEIRA**  
Mestre em Ciência de Alimentos

**Dr. FUMIO YOKOYA**  
Orientador

**Dr. PEDRO DE OLIVA NETO**  
Co-orientador

**Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos.**

**Campinas – SP  
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 BIBLIOTECA  
DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

OL4a Oliveira, Fernanda de  
Aproveitamento do farelo residual do processamento  
De fécula de mandioca na produção de bioetanol /  
Fernanda de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Fumio Yokoya.  
Co-orientador: Pedro de Oliva Neto.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amido. 2. Hidrólise ácida. 3. Etanol. 4.  
Farelo de Mandioca. 5. Tratamento termopressurizado.  
I. Fumio Yokoya. II. Oliva Neto, Pedro de. III.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Utilization of residual bran processing of cassava starch in the  
production of bioethanol

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Starch

Acid hydrolysis

Ethanol

Cassava bagasse

Thermopressurized treatment

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Fumio Yokoya [Orientador]

Luciana Francisco Fleuri

Vitório dos Santos Junior

Wilma Aparecida Spinosa

José Luiz Pereira

Data da defesa: 10/11/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**FERNANDA DE OLIVEIRA**

**APROVEITAMENTO DO FARELO RESIDUAL DO PROCESSAMENTO DE  
FÉCULA DE MANDIOCA NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS.**

**Dr. FUMIO YOKOYA**  
Orientador

**Dr. PEDRO DE OLIVA NETO**  
Co-orientador

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por  
Fernanda de Oliveira aprovada pela comissão julgadora em  
\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e orientada pelo Prof. Dr. Fumio Yokoya.

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2011**



## **BANCA EXAMINADORA**

Tese defendida e aprovada em        de        de 2011, pela banca  
examinadora constituída pelos professores:

---

Fumio Yokoya  
(orientador)

---

José Luiz Pereira  
(membro)

---

Vitório dos Santos Junior  
(membro)

---

Luciana Francisco Fleuri  
(membro)

---

Wilma Aparecida Spinosa  
(membro)

---

Francisco Maugeri Filho  
(suplente)

---

Marta Cristina Teixeira Duarte  
(suplente)

---

Daniel I. P. Atala  
(suplente)



## DEDICATÓRIA

“Se consegui enxergar mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes”

*(Isaac Newton)*

*A DEUS por estar aqui!!!*

*Aos meus pais, às minhas irmãs, à minha família  
e aos amigos por todo amor que demonstraram!!!*

*Obrigada por acreditarem em mim!!!*

*A vocês dedico este trabalho!!!*





## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação segura, confiança e tolerância;

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto meu eterno reconhecimento pela orientação, paciência, amizade, apoio, carinho e respeito durante todo este período de convivência;

Aos meus amigos Luciana e Vitório pela valiosa amizade, orientação e colaboração nas análises estatísticas;

À Aline Freitas pela colaboração nas análises;

Aos membros da banca examinadora, pelas importantes correções, que contribuíram para o enriquecimento do trabalho;

À Empresa Halotek Fadel pela doação do farelo de mandioca utilizado nos experimentos;

À UNESP e UNIP pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho;

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

O grande desafio para a produção de etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise do amido em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade. O farelo de mandioca produzido durante o processamento da fécula foi usado como fonte econômica para a biomassa e produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* M-26. A suspensão de farelo de mandioca e água 5 % (p/v) foi hidrolisada utilizando como catalisador os ácidos sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e fosfórico ( $H_3PO_4$ ) em diferentes faixas de pH (0,5, 1,0 e 1,5), a uma temperatura 120 °C por 30, 60 e 90 minutos de reação. Os resultados demonstraram que o emprego do  $H_2SO_4$  foi suficiente para hidrolisar o amido, obtendo uma concentração de 2,93 % de açúcares redutores e 2,62 % de glicose, com rendimento de 96,48 % de açúcares redutores, em pH 0,5 e tempo de reação 90 minutos. Nas mesmas condições, o tratamento com  $H_3PO_4$  obteve 2,52 % de açúcares redutores e 1,99 % de glicose, com um rendimento de 82,87 % de açúcares redutores, concluindo que a hidrólise é tanto mais rápida quando maior o poder ionizante do ácido e que o pH 1,5 é fracamente glucogênico enquanto que a acidez mais drástica (pH 0,5) já é mais glucogênica. Concentrações baixas do furfural subproduto hidroximetil (HMF) foram gerados durante a hidrólise do amido quando usou  $H_2SO_4$  em comparação ao  $H_3PO_4$ . Os tratamentos com  $H_2SO_4$  produziram 0,17 g/L e 0,02 g/L de HMF após 90 minutos de reação em pH 0,5 e 1,5, respectivamente. Já os tratamentos utilizando o catalisador  $H_3PO_4$  não geraram concentrações detectáveis de HMF. As amostras obtidas dos tratamentos em pH 0,5 apresentaram menor quantidade de farelo residual em relação as amostras provenientes dos tratamentos em pH 1,0 e 1,5. A linhagem de *S. cerevisiae* M-26 foi capaz de utilizar e fermentar o hidrolisado e o rendimento teórico de etanol (50,59 %) foi alcançado a 32 °C após 12 horas.

**Palavras-chave:** farelo de mandioca, hidrólise ácida, etanol, amido, tratamento termopressurizado.



## SUMMARY

The great challenge for the production of second generation ethanol is to determine the best option available bagasse produced during processing of starch was used as an economical source for biomass and bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* M-26. The suspension of cassava bagasse and water 5% (w/v) was hydrolyzed using sulfuric acid as the catalyst ( $H_2SO_4$ ) and phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ) in different pH ranges (0.5, 1.0 and 1.5), at a temperature 120 °C for 30, 60 and 90 minutes of reaction. The results showed that the use of  $H_2SO_4$  was sufficient to hydrolyze the starch, giving a concentration of 2.93 % of reducing sugars and 2.62 % glucose, with a yield of 96.48 % of the reducing sugars at pH 0.5 and 90 minutes reaction time. Under the same conditions, treatment with  $H_3PO_4$  received 2.52 % of reducing sugars and 1.99 % glucose, with a yield of 82.87 % of reducing sugars, concluding that the hydrolysis is much faster when the more powerful acid, and ionizing pH 1.5 that is weakly acidic glycogen while the most drastic (pH 0.5) is already more glycogen. Low concentrations of byproduct 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) were generated during the hydrolysis of starch when used  $H_2SO_4$  in relation the  $H_3PO_4$ . The treatments with  $H_2SO_4$  produced 0.17 g/L and 0.02 g/L of 5-HMF after 90 minutes of reaction at pH 0.5 and 1.5, respectively. Since the treatments using the catalyst  $H_3PO_4$  did not generate detectable concentrations of 5-HMF. The samples of the treatments at pH 0.5 had a lower amount of bran remaining on the samples from the treatments at pH 1.0 and 1.5. The strain of *S. cerevisiae* M-26 were able to utilize and ferment the hydrolyzate and the theoretical yield of ethanol (50.59 %) was achieved at 32 °C after 12 hours.

Keywords: cassava bagasse, acid hydrolysis, ethanol, starch, thermopressurized treatment.



## INDÍCE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
RESUMO .....	vii
SUMMARY .....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Mandioca .....	5
2.2 Amido.....	9
2.3 Lignocelulose.....	10
2.4 Produção de etanol a partir do farelo de mandioca.....	12
2.4.1 Hidrotermólise.....	15
2.4.1.1 Hidrólise do amido.....	16
2.4.1.2 Hidrólise da lignocelulose.....	21
2.4.2 Processo fermentativo .....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Mandioca .....	27
3.2 Microrganismo.....	27
3.3 Planejamento experimental.....	28
3.4 Hidrotermólise ácida do amido.....	29
3.5 Tratamento do hidrolisado para processo fermentativo.....	29
3.6 Ensaios fermentativos .....	30
3.7 Análises Físico-Químicas .....	31
3.7.1 Caracterização do farelo de mandioca.....	31
3.7.2 Caracterização do hidrolisado .....	31
3.7.3 Rendimento da hidrólise.....	32
3.7.4 Determinação da massa seca .....	32
3.7.5 Determinação de etanol.....	32
3.7.6 Determinação de acidez.....	33





3.8 Análises microbiológicas .....	34
3.8.1 Viabilidade celular .....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1 Caracterização do farelo de mandioca .....	34
4.2 Caracterização do hidrolisado .....	36
4.2.1 Catalisador ácido sulfúrico .....	37
4.2.1.1 Açúcares redutores .....	37
4.2.1.2 Glicose .....	45
4.2.2 Catalisador ácido fosfórico .....	52
4.2.2.1 Açúcares redutores .....	52
4.2.2.2 Glicose .....	59
4.2.3 Derivados do furano .....	65
4.2.4 Massa residual de farelo .....	66
4.2.5 Ensaio fermentativo .....	67
5 CONCLUSÃO .....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73



## ÍNDICE DAS TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição química da raiz de mandioca em massa seca (%) .....	6
<b>Tabela 2</b>	Valores decodificados das variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial.....	28
<b>Tabela 3</b>	Planejamento fatorial codificado e decodificado para estudo do efeito do tempo de processo e pH no rendimento do processo de hidrólise.....	29
<b>Tabela 4</b>	Composição físico-química do farelo de mandioca .....	35
<b>Tabela 5</b>	Análise da suspensão inicial de farelo de mandioca e água (5 %) utilizado para o processo de hidrólise .....	37
<b>Tabela 6</b>	Valores de açúcares redutores (AR) e rendimentos nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido sulfúrico .....	38
<b>Tabela 7</b>	Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (tempo de reação e pH) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico .....	39
<b>Tabela 8</b>	Valores observados, preditos e resíduos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico .....	41
<b>Tabela 9</b>	Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	42
<b>Tabela 10</b>	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	42
<b>Tabela 11</b>	Valores da concentração de glicose nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	45
<b>Tabela 12</b>	Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (tempo de reação e pH) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico .....	46
<b>Tabela 13</b>	Valores observados, preditos e resíduos no processo de hidrólise na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	48
<b>Tabela 14</b>	Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	49



<b>Tabela 15</b>	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico .....	49
<b>Tabela 16</b>	Valores de AR e rendimentos nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	52
<b>Tabela 17</b>	Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	53
<b>Tabela 18</b>	Valores observado, predileto e residual no processo de hidrólise utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	55
<b>Tabela 19</b>	Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico .....	56
<b>Tabela 20</b>	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	56
<b>Tabela 21</b>	Valores de concentração de glicose nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	59
<b>Tabela 22</b>	Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico .....	60
<b>Tabela 23</b>	Valores observado, predito e residual na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	61
<b>Tabela 24</b>	Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de glicose. ....	62
<b>Tabela 25</b>	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	63
<b>Tabela 26</b>	Massa de farelo residual após os tratamentos de hidrólise.....	66
<b>Tabela 27</b>	Valores de tempo de fermentação, concentração de açúcares redutores (AR), pH, acidez do vinho e concentração de etanol.....	67



## ÍNDICE DAS FIGURAS

<b>Figura 1</b> Balanço de massa do processamento industrial de raízes de mandioca para produção de fécula.....	7
<b>Figura 2</b> Matéria-prima utilizada nos experimentos.....	27
<b>Figura 3</b> Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de AR (%) do hidrolisado utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	40
<b>Figura 4</b> Valores observados e preditos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	41
<b>Figura 5</b> Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR na hidrólise do farelo utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	44
<b>Figura 6</b> Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	44
<b>Figura 7</b> Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	46
<b>Figura 8.</b> Valores observados e preditos na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	48
<b>Figura 9.</b> Superfície de resposta obtida no planejamento experimental fatorial para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	51
<b>Figura 10.</b> Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.....	51
<b>Figura 11.</b> Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	53
<b>Figura 12.</b> Valores observados e preditos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	54





<b>Figura 13.</b> Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR na hidrólise ácida do farelo utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	58
<b>Figura 14.</b> Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	58
<b>Figura 15.</b> Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	61
<b>Figura 16.</b> Valores observados e preditos na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	62
<b>Figura 17.</b> Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose na hidrólise ácida do farelo utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	64
<b>Figura 18.</b> Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.....	65
<b>Figura 19.</b> Concentração de açúcares redutores (AR) e de etanol após 12 horas de fermentação.....	68
<b>Figura 20.</b> Acidez total do material fermentado no tempo inicial (0), após 8 e 12 horas de fermentação.....	69
<b>Figura 21.</b> Células da linhagem <i>S. cerevisiae</i> M-26 após fermentação, com destaque para a formação de brotos.....	70
<b>Figura 22.</b> Viabilidade celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> M-26 após 12 horas de fermentação.....	70

## 1. INTRODUÇÃO

O mundo se encontra diante de uma grave situação para o seu suprimento sustentável de energia, e este problema tem um número reduzido de soluções, principalmente no que tange aos combustíveis fósseis. O fornecimento da energia sustentável é fundamental não apenas para o desenvolvimento econômico das nações, mas também para assegurar o bem estar do cidadão.

Diversos países voltaram suas atenções para a produção e consumo de biocombustíveis nos últimos anos. Tal interesse se deve a fatores como a necessidade de mitigação das emissões dos gases de efeito estufa, as oscilações no preço do petróleo, a busca por uma matriz energética mais diversificada e o desenvolvimento do setor agrícola.

O álcool é uma fonte renovável de energia menos poluente, que integra parte da matriz energética nacional e está sendo um dos produtos mais importantes do mercado internacional. Devido à sua importância sócio-econômica, tendo em vista a utilização deste produto em indústrias de alimentos e, como fonte combustível ecologicamente correta, estudos visando a obtenção de melhores procedimentos tecnológicos no processo fermentativo tornam-se de fundamental importância.

De acordo com os dados publicados pelo Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE, 2010), a substituição de gasolina por etanol levaria a uma redução no total de emissões de gases de efeito estufa (GEE) em torno de 2,6 toneladas CO<sub>2</sub> eq./m<sup>3</sup> (etanol anidro) e 1,7 toneladas CO<sub>2</sub> eq./m<sup>3</sup> (etanol hidratado).

Brasil e Estados Unidos dominam a produção e consumo de etanol, o que representa mais de 80% do mercado mundial. Por décadas, a produção de etanol brasileiro foi a maior do mundo, entretanto em 2006 os Estados Unidos a superou devido à investimentos governamentais pela criação em 2005 da *Renewable Fuels Standard* (WALTER *et al.*, 2008).

O Brasil é o maior produtor de etanol de cana de açúcar do mundo e ocupa posição de liderança na tecnologia de sua produção (CTBE, 2010). Essa liderança e competitividade devem-se ao longo trabalho de muitos anos feito por pesquisadores em instituições de ensino e pesquisa e em empresas privadas.

O clima favorável, a disponibilidade de terras e a diversidade das matérias-primas disponíveis são fatores que favorecem a expansão continental dos biocombustíveis de maneira sustentável no Brasil.

O uso da cana de açúcar, milho, mandioca e outros produtos agrícolas para obtenção de álcool pode causar uma possível problemática no suprimento alimentício pelo crescimento da população mundial. Nos últimos tempos há uma crescente busca de maior utilização de resíduos agroindustriais, como por exemplo: bagaço de cana de açúcar, farelo de mandioca, polpa de tomate, entre outras.

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) foi reconhecida pelo Pró-Álcool como uma das melhores fontes renováveis alternativas à cana-de-açúcar, para a produção de bioetanol, apresentando vantagens sobre a cana-de-açúcar, tais como: maior produção de etanol por tonelada, menor exigência em relação à fertilidade do solo, maior tolerância a variações climáticas e menor necessidade de água (MENEZES, 1980).

Segundo Cabello (2007), em termos de Brasil, comparando as principais matérias-primas para produção de etanol (cana e milho), a mandioca só não mostrou viabilidade superior à cana, sendo nesse sentido, mais viável que o milho. O fato da mandioca não mostrar viabilidade frente à cana-de-açúcar ocorre pelo fato daquela cadeia produtiva ter experimentado períodos de elevados investimentos no setor, o que levou à modernização do mesmo.

De acordo com Alves (2005), enquanto uma tonelada de cana com 140 kg de Açúcar Total Recuperável (ATR) produz 85 litros de álcool, uma tonelada de mandioca com rendimento de 20 % de amido pode produzir até 104 litros de álcool.

A mandioca tem um grande potencial de utilização para produção de etanol e pode colaborar substancialmente para diminuir os impactos sociais e ambientais decorrentes da produção desta *commodity*.

Nas fecularias, para cada tonelada de raiz processada são produzidos, cerca de, 928,6 kg de farelo com 85 % de umidade. Após secagem este resíduo apresenta em média 75 % de amido e 11,5 % de fibras (LEBOURG, 1996). Diante de sua composição e da considerável quantidade gerada várias pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de aproveitar este resíduo.

Atualmente vem crescendo a utilização de resíduos agro-industriais com o objetivo de recuperar materiais e substâncias e assim aumentar a eficiência econômica dos processos de produção. A aplicação de bioprocessos em resíduos agro-industriais não só contribui para minimizar o impacto ambiental como atribui um valor econômico a esses substratos.

Além do aspecto da agressão ao meio ambiente, deve ser também considerado que o despejo indevido dos subprodutos de mandioca constitui em desperdício de rendimentos para o produtor, quando se consideram as quantidades geradas e a composição dos subprodutos (CEREDA, 2001).

Diversos processos são desenvolvidos para utilização de resíduos agroindustriais transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado, como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A utilização desses materiais em bioprocessos é uma racional alternativa para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição (PANDEY *et al.*, 2000).

Estudos de aproveitamento da biomassa são muito importantes no sentido de desenvolver a refinaria da biomassa, que combinaria produtos dependendo do mercado, preço e outros fatores.

## **Objetivos Gerais**

Estudar a conversão do resíduo amiláceo presente no farelo de mandioca em açúcares fermentescíveis, através de tratamento ácido e termopressurizado, e a posterior fermentação deste açúcar pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* M-26.

## **Objetivos Específicos**

- a) Estudar o emprego do tratamento ácido e termopressurizado na hidrólise de amido;
- b) Estudar a associação do ácido sulfúrico com o tratamento termopressurizado no processo de hidrólise para produção de bioetanol;
- c) Estudar a associação do ácido fosfórico com o tratamento termopressurizado no processo de hidrólise para fins alimentícios;
- d) Caracterizar o perfil de composição dos produtos e resíduos de reação de cada tratamento ácido termopressurizado;
- e) Analisar e comparar o rendimento do processo de hidrólise nos diferentes tratamentos ácidos;
- f) Estudar e analisar o rendimento e produtividade em etanol no processo de fermentação pela levedura *S. cerevisiae* M-26 a partir de farelo de mandioca.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária da América do Sul, provavelmente da Amazônia, cultivada desde o descobrimento do Brasil pelos indígenas, é uma planta arbustiva, dicotiledônea, perene, heliófila, da família *Euphorbiaceae* (VIANA *et al.*, 2002).

A mandioca é uma espécie domesticada pelas populações pré-colombianas com o objetivo de armazenar amido nas raízes e tornou-se a base alimentar de várias populações indígenas e complementar para outras, desempenhando um importante papel sócio-econômico em vários países tropicais, principalmente na África e na América (FAO, 2006).

A cultura de mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos, tais como: fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouca exigência em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita sem grandes perdas na matéria seca (MENEZES, 1980; PRIMO-YUFERA *et al.*, 1995).

A mandioca no Brasil é tradicionalmente voltada para alimentação humana quer na forma de amido e seus derivados, farinha de mandioca e em menor escala na alimentação animal. Em todo o Brasil predominam culturas de subsistência e produções em pequena escala voltadas para consumo próprio e pequenos mercados locais e regionais. Paralelamente, com tecnologia totalmente brasileira, produz e processa cerca de cinco a seis milhões de toneladas de raízes por ano, aproximadamente (VALLE, 2010).

A mandioca apresenta bom desenvolvimento em solos férteis, mas também satisfatório em solos pobres, mesmo com baixo nível de adubação, onde outras culturas são inviáveis. Esse comportamento é explicado pela eficiente associação com micorrizas e ou associação com outros micro-organismos fixadores de nitrogênio não pertencentes ao grupo *Rhizobium*, tema pouco estudado, mas comprovadamente eficiente (COOK, 1985).

A mandioca apresenta raízes de reserva que são o principal órgão de armazenamento dos carboidratos produzidos. Pela legislação brasileira o carboidrato de reserva de raízes é denominado fécula e por ser de fácil extração e purificação, sua importância no setor alimentar e industrial tem aumentado (DAIUTO *et al.*, 2002).

As raízes são essencialmente calóricas, caracterizando-se como culturas de subsistência para alimentação humana e animal, conforme citado por Cereda (2002). O consumo da mandioca é predominantemente *in natura*. Para fins industriais, destaca-se a farinha e a fécula (CEREDA, 2002).

A raiz de mandioca apresenta cerca de 2 % de fibra, em geral expressa como celulose e 30 % de amido. Na extração, cerca de 30 % do amido residual fica retido em menos que 3 % de fibra, que absorve grandes quantidades de água, o que explica porque praticamente cada tonelada de raiz equivale uma tonelada de farelo úmido com 60 a 65 % de umidade (MOTTA, 1985).

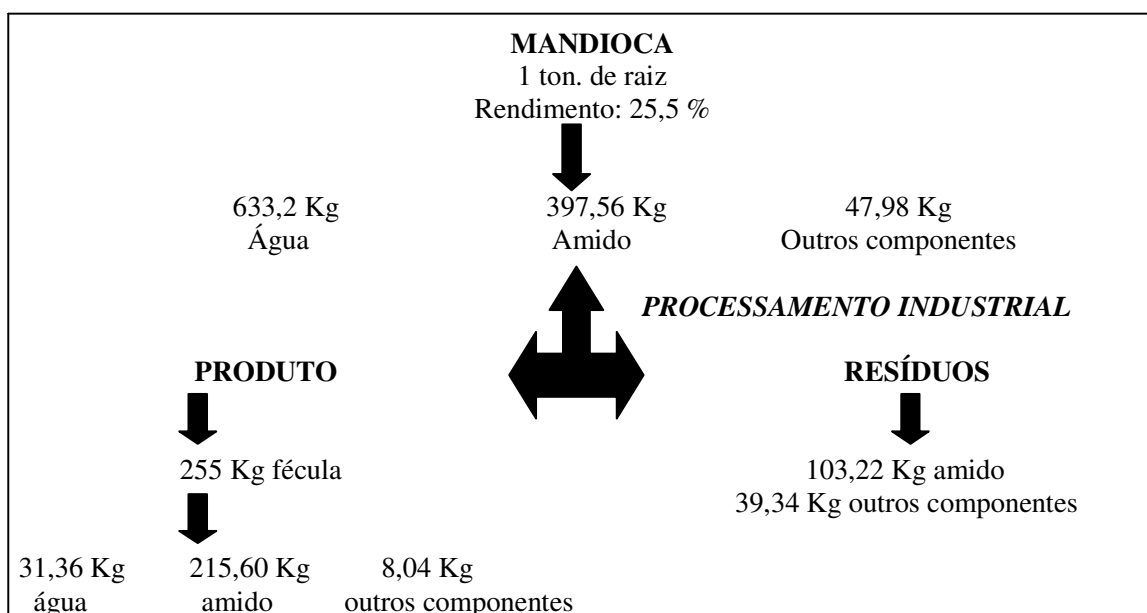
A composição da mandioca varia com a espécie, idade e condições de cultivo. Por apresentar elevado teor de amido e baixos teores de gorduras, proteínas e cinzas, a mandioca é matéria-prima para obtenção, por hidrólise, de derivados (CEREDA, 2001).

**Tabela 1.** Composição química da raiz de mandioca em massa seca (%) (CEREDA, 2001).

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

Os principais tipos de processamento das raízes de mandioca no Brasil, como a fabricação de farinha de mandioca e a extração de fécula, geram subprodutos que podem ser sólidos ou líquidos. Alguns dos subprodutos sólidos são a casca marrom, a entrecasca, o descarte, a crueira, a fibra, o bagaço e a varredura. Entre os resíduos líquidos cita-se a manipueira (CEREDA, 1994).

O rendimento industrial do processamento de mandioca para a produção de fécula está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Balanço de massa do processamento industrial de raízes de mandioca para produção de fécula (LEBOURG, 1996).

O resíduo líquido é despejado em tanques de evaporação e/ou fertirrigação, dentre os resíduos sólidos, as cascas são lançadas ao solo e utilizadas como fertilizante e o farelo úmido é doado, podendo ainda ser utilizado como ração para gado (SAITO, 2005).

Quando as indústrias processam a raiz para extração do amido, eliminam em torno de 2 % de amido com a água residuária, denominada manipueira. Esta água precisa passar por um tratamento especial, antes de ser devolvida a natureza, o que gera uma despesa extra para as indústrias (CEREDA, 1996).



O aproveitamento da manipueira na produção do etanol, a partir de um simples processo de destilação, se resolve o problema, e se obtém o álcool, indicado para uso em diversos setores como a fabricação de cosméticos, medicamentos e outros fins (CEREDA, 1996).

A produção de fécula de mandioca resulta em torno de 10 a 15 % de resíduos originários da raiz, denominado farelo que após a secagem apresenta média de 10 % de umidade, 15 % de fibras e 75 % de amido, com pH 5,5. (LEONEL & CEREDA, 2000).

Nas fecularias para cada tonelada de raiz processada são produzidos cerca de 928,6 kg de farelo com 85 % de umidade e tem se apresentado como um grande problema para os industriais, que doam ou vendem o resíduo a preços muito baixos a fazendeiros para a alimentação animal (CEREDA, 1996).

Uma alternativa viável seria a redução do impacto ao ambiente através da valorização do farelo em outra forma de amido ou açúcar. Um maior desenvolvimento de métodos físicos e biotecnológicos é necessário para o uso desse resíduo (SRIROTH *et al.*, 2000).

De acordo com Pandey *et al.* (2000) 100 g de farelo de mandioca apresenta umidade entre 5,02 a 11,2 %; 40,50 a 63,85 g de carboidratos; 0,32 a 1,61 g de proteína; 0,52 a 1,06 g de lipídios e 14,88 a 50,55 g de fibras.

O farelo de mandioca apresenta pequenas concentrações de matérias graxas e proteínas e, portanto o seu hidrolisado necessita ser aditivado com outros materiais para torná-lo adequado à fermentação alcoólica (BRINGHENTI *et al.*, 2007).

A utilização do farelo de mandioca como matéria-prima para produção de etanol gera outros resíduos, como a vinhaça e o resíduo fibroso final, os quais devem ter um destino, de preferência lucrativo, e não prejudicar o meio ambiente (CEREDA, 1994).

A vinhaça pode ser utilizada "in natura" na alimentação animal, como se utiliza a gerada no processo de produção de álcool fino de cereais (LEONEL, 1998). Já o resíduo fibroso final poderia ser aproveitado como fonte de fibras dietéticas, produto esse de elevado valor agregado (LEONEL & CEREDA, 1997).

A cana-de-açúcar acumula seus carboidratos na forma solúvel, que são consumidos no processo de fermentação por leveduras alcoólicas. O mesmo não ocorre com a mandioca, que acumula seus carboidratos na forma de grânulos insolúveis de amido, requerendo um tratamento para disponibilizá-lo ao consumo das leveduras.

O requerimento de um pré-tratamento como diferença de processo ainda é, à primeira vista, uma desvantagem para o amido, mas, por outro lado, esses carboidratos se apresentam em maiores concentrações por unidade de matéria prima vegetal, o que significa uma vantagem, por diminuir, consideravelmente, o manuseio dos significativos volumes mássicos, com implicações em investimentos; custeio do sistema; custos de logística, energia, mão de obra, remoção de resíduos, entre outros.

## 2.2 Amido

A fécula de mandioca é composta de 18 % de amilose e 82 % de amilopectina, em relação ao total da molécula de amido. (LEONEL & CEREDA, 1997).

O amido é o carboidrato de reserva das plantas, mas apresenta usos diversos em alimentação humana, animal e industrial e é constituído principalmente por dois polímeros, a amilose e a amilopectina, distribuídos em diferentes proporções no grânulo. A funcionalidade do amido, assim como sua organização física na estrutura granular, é, em grande parte, atribuída à proporção destes dois polímeros (BILIADERES, 1991).

A amilose é um polímero linear composto de várias centenas de unidades de glicose unidas através de ligações  $\alpha$ -D-(1→4). A amilopectina é um polímero ramificado contendo várias centenas de milhares a vários milhões de unidades de D-glicosil unidas por ligações  $\alpha$ -D-(1→4) e  $\alpha$ -D-(1→6) (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

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

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

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

Segundo Bobbio & Bobbio (1992) quando a temperatura é suficientemente elevada, ambas as regiões, amorfas e cristalinas, são gelatinizadas tornando soluções consideravelmente viscosas; uma vez que, as moléculas de amilose e amilopectina se desenrolam e se dispersam em solução.

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

Sob baixas temperaturas de aquecimento, próxima à temperatura de início, a gelatinização ocorre primeiramente nas regiões amorfas do grânulo. Sob aquecimento continuado à mesma temperatura, eventualmente todas as regiões amorfas são desestabilizadas e as regiões cristalinas começam a gelatinizar (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

### **2.3 Lignocelulose**

As lignoceluloses são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera abrangendo aproximadamente 50 % da biomassa no mundo e estão presentes nos processos

residuais da agricultura, florestas, frutas e vegetais. São polímeros organizados e com ligações covalentes e ligações de hidrogênio acompanhadas diretamente na combinação com ligações de forças Van der Waals (OVEREND, 1987).

A lignocelulose representa mais de 90 % do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie, a idade e entre as partes de uma planta. Em média, a lignocelulose consiste de 45 % de celulose, 30 % de hemicelulose e 25 % de lignina (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

Os resíduos de lignocelulose podem gerar fonte de energia através da produção de etanol. Entretanto progressos consideráveis existem na tecnologia para a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol, com redução de custo (BALLESTEROS *et al.*, 2002).

A natureza estrutural da molécula de celulose, constituídas de unidades D-glicose unidas por ligações tipo  $\beta$ -1,4 altamente ordenadas, confere características estruturais a esta, tornando difícil a sua separação do complexo lignocelulósico e particularmente ao processo de hidrólise deste polímero. As ligações de hidrogênio conferem às cadeias de celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida (BOBBIO & BOBBIO, 1989).

A porção de celulose insolúvel em base forte (ex: NaOH 18 %) é chamada de alfa-celulose e a parcialmente precipitada em condições neutras é dita beta-celulose. Já restante dissolvida é a gama-celulose (BOBLETER, 1994).

A hemicelulose é constituída por unidades de pentoses (xilanas) ou alternadas de manoses e glicoses ou de galactoses. Possuem cadeias laterais de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses que são responsáveis pela solubilidade em água e/ou em álcalis (PEREIRA JR., 1999).

Nas plantas, as hemiceluloses estão na maioria, conectadas às ligninas, através de ligações covalentes, e assim fixadas à estrutura fibrosa. Para o isolamento da hemicelulose, é necessário quebrar as ligações lignina - polissacarídeo através de processo hidrotérmico que pode ser seguido ou não de rápida descompressão. Há o desarranjo da estrutura física

do material e facilitando a extração de um liquor composto principalmente de xilose com pequeno grau de polimerização ( $< 10$ ) (SCHUCHARDT *et al.*, 2001).

A lignina, ao contrário da celulose e da hemicelulose, possui uma estrutura aromática que forma uma rede macromolecular tridimensional e é mais hidrofóbica (BOBLETER, 1994). É o mais abundante composto fenólico na natureza, sendo polímeros formados pela união covalente de três tipos de monômeros: álcoois *p*-cumarílico, guaiacílico e sinapílico. As ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e sistemas enzimáticos (FUKUSHIMA *et al.*, 2003).

#### **2.4 Produção de bioetanol a partir do farelo de mandioca**

Várias pesquisas são desenvolvidas no sentido de aproveitar o farelo de mandioca, visando gerar uma nova receita para as fecularias, além de beneficiar o meio ambiente. Frente ao elevado teor de amido, uma das linhas de pesquisa que tem suscitado o interesse dos industriais é a produção de etanol a partir deste resíduo.

O bioetanol a partir da mandioca deveria ser incentivado em regiões onde as condições do solo são impróprias para o cultivo da cana-de-açúcar e, apropriadas para esta raiz, que é pouco exigente em fertilidade. A produção pode ocorrer em regiões de baixa densidade demográfica e de baixa renda per capita, como forma de melhorar a distribuição de renda no país (CEREDA, 2001).

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

A produção de etanol a partir de mandioca segue uma linha industrial semelhante à fabricação desse álcool a partir de cereais. As principais operações unitárias envolvidas na manufatura do álcool etílico industrial a partir da mandioca pelo processo ácido e enzimático de hidrólise de amido são (VILELA & FERREIRA, 1987):

a. Pesagem, Lavagem e Descascamento: após a pesagem as raízes são lavadas e descascadas para a eliminação de impurezas como terra e areia.

b. Desintegração: é feita para aumentar a superfície e facilitar a penetração do calor, o processo de gelificação e o ataque enzimático ou ácido, durante a sacarificação do amido.

c. Sacarificação: é realizada através do uso do ácido mineral ou enzimas comerciais.

d. Fermentação: é o processo bioquímico, que ocorre no citoplasma da levedura alcoólica, responsável pela transformação de açúcar em álcool etílico.

e. Destilação: o mosto fermentado ou vinho é destilado. Processo de separação de componentes de uma mistura que está baseado na volatilidade de cada um desses componentes, numa determinada temperatura e pressão.

Um dos principais problemas no processo de produção de etanol de farelo é a concentração de sólidos, que em concentrações acima de 10 % o rendimento é baixo, devido a problemas de transferência de calor, homogeneização da pasta e sacarificação não uniforme (SRIKANTA *et al.*, 1987).

Segundo Leonel & Cereda (1995) parte dos açúcares obtidos fica retida no resíduo fibroso final e a lavagem deste com água não demonstrou ser viável, visto que promove uma diluição acentuada do hidrolisado sendo necessária a concentração para fermentação ou uso de maior volume de tanques.

Embora o desenvolvimento de um processo eficiente e econômico para produção de etanol a partir do farelo possa resultar em sua utilização, o mesmo gera por sua vez outros resíduos, como a vinhaça e o resíduo fibroso final, os quais devem ter um destino, de preferência lucrativo, e não prejudicar o meio ambiente (JALEEL *et al.*, 1988; KUNHI *et al.*, 1981; LEONEL, 1998; SRIKANTA *et al.*, 1987).

Os alcoóis oriundos de matérias primas amiláceas, como cereais e mandioca, destilados em equipamentos convencionais, possuem características organolépticas superiores às do álcool de cana. Desta forma, quanto mais neutro um álcool, menos perceptível se torna a diferença entre o produto oriundo da cana, de cereais ou da mandioca (ABAM, 2005).

A mandioca possui metabolismo C3 enquanto a cana-de-açúcar C4. Sendo assim, o álcool de resíduo amiláceo apresenta concentração isotópica do tipo C3 que é próprio para bebidas, produtos farmacêuticos e perfumaria (ABAM, 2005).

A dificuldade de obtenção de enzimas, a não diferenciação de preços entre o álcool de mandioca e de cana-de-açúcar; e, a forte concorrência do álcool de mandioca com o de cana nos setores de perfumaria, de cosmético e farmacêutico, são fatores desfavoráveis na produção de álcool de mandioca (ABAM, 2006).

A construção de uma usina de álcool de cana-de-açúcar, com capacidade de moagem anual de um milhão de toneladas de cana, tem-se um investimento na ordem de R\$ 130 milhões a R\$ 140 milhões, se incluído neste valor o parque industrial e a parte agrícola. Já a construção de uma usina de álcool de mandioca com capacidade de moagem anual de 300 mil toneladas de mandioca é necessário investimento na ordem de R\$ 25 milhões, incluindo-se neste valor o parque industrial de, aproximadamente, R\$ 20 milhões, e mais R\$ 5 milhões no plantio de mandioca (FADEL, 2006).

Segundo Fadel (2006), a produção anual de álcool de mandioca está estimada na ordem de 60 milhões de litros de álcool, para uma área de 10 mil a 11 mil hectares de terra e o álcool da cana tem uma produção estimada de 85 milhões de litros de álcool, necessitando-se de área agrícola com cerca de 13 mil hectares de terra.

Apesar do resultado favorável à mandioca, quando se calcula a produção por hectare observou-se que um hectare de cana-de-açúcar em São Paulo, com produtividade de 81 t/ha, resulta em 6.934 litros de álcool. Já um hectare de mandioca em São Paulo, produzindo 24,8 t/ha, pode ser transformado em 2.589 litros de álcool (FADEL, 2006).

### 2.4.1 Hidrotermólise

A hidrólise pode ser realizada na presença de catalisadores ácidos ou alcalinos ou através do tratamento enzimático. A hidrólise realizada na presença de catalisadores ácidos (hidrólise ácida) ou alcalinos (hidrólise alcalina) envolve os custos de recuperação destes catalisadores e problemas de corrosão (KIM *et al.*, 2000).

Ácidos concentrados como ácido sulfúrico e ácido clorídrico são tóxicos, corrosivos e perigosos, requerem reatores que são resistentes à corrosão. O ácido concentrado pode ser recuperado depois da hidrólise processo este economicamente possível (SUN & CHENG, 2002).

Os processos termoquímicos podem ser divididos em pirólise, gaseificação, extração supercrítica, liquefação (realizada a baixa temperatura, alta pressão e na presença de catalisador). E por último os processos de hidrotermólise, que convertem biomassa com água a altas pressões (DEMIRBAS, 2001).

A hidrotermólise, que emprega água sub e supercrítica como meio de reação oferece altas taxas de conversão em curtos intervalos de tempo quando comparado com processos de biodegradação baseado em microorganismos. A hidrólise com água subcrítica é rápida (tempo de reação varia de alguns segundos a poucos minutos) e seletiva, de acordo com a variação de temperatura e pressão do processo (MORESCHI, 2004).

A combinação de tempo e temperatura é chamada de coeficiente de severidade que permite comparações de diferentes processos e parâmetros de rendimentos de frações catalisados por ácido (SAITO, 2005).

As altas temperaturas também funcionam como uma barreira higiênica contra contaminantes perigosos como os organismos patogênicos (ALBRECHT & BRUNNER, 2001).

Reações hidrotermais em recipientes com água quente pressurizada produzem uma eficiente separação dos carboidratos, hemiceluloses e celuloses existentes nas lignoceluloses das plantas por meio de reações de hidrólise. O açúcar é esperado como produto e, aldeídos e ácidos orgânicos são obtidos colateralmente com a reação hidrotérmica (MOCHIDZUKI *et al.*, 2003).



A hidrólise no processo hidrotérmico é mais intensa do que a hidrólise no processo enzimático sugerindo que esta tecnologia seja usada para tratamento de grande quantidade de materiais originárias da biomassa vegetal. Entretanto no processo hidrotérmico é relativamente difícil a otimização de sua pressão porque no tratamento com água quente a reação tem baixa seletividade.

A hidrotermólise ou auto-hidrólise acontece sob o efeito catalisador do íon hidrônio, sendo que este é inicialmente fornecido pela auto-ionização da água, e depois pelos ácidos gerados na reação, fazendo com que o pH do meio reacional esteja entre 3 - 4 (GARROTE *et al.*, 2001).

A água supercrítica tem alta solubilidade para compostos orgânicos e reduzida para sais em relação às condições ambientes. O aumento da solubilidade pode aumentar a concentração dos reagentes acelerando as taxas de reações em condições supercríticas (SAVAGE *et al.*, 1995).

O uso da água subcrítica como solvente vem de encontro aos interesses por processos limpos de transformação. Devido às suas propriedades, a água subcrítica vem sendo usada para um grande número de aplicações como reações de oxidação, hidrólise/pirólise e extrações de substâncias hidrofóbicas, tais como aromas, óleos essenciais, poluentes do solo e hidrocarbonetos de petróleo.

#### **2.4.1.1 Hidrólise do amido**

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

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

A hidrólise enzimática de biomassa pode ser seletiva, porém o custo ainda é relativamente alto devido à complexidade dos carboidratos presentes no farelo de mandioca que requerem diferentes enzimas (SUN & CHENG, 2002).

A hidrólise ácida do amido é randômica inicialmente produz fragmentos lineares e ramificados até a formação de dextrinas. A reação se torna mais rápida conforme a temperatura da reação aumenta (WHISTLER, 1984). Porém, tem como desvantagem evidente a necessidade de neutralização da solução açucarada após a hidrólise que produz quantidades significativas de sal (MORESCHI, 2004).

O maior problema da hidrólise ácida é que a decomposição de açúcares monoméricos produzidos durante a reação ocorre simultaneamente com a hidrólise de polissacarídeos, portanto é necessário escolher melhores condições de reação, tipo de reator e modo de operação que minimizem este processo (KIM *et al.*, 2000).

O amido em meio ácido, a reação favorecida é a hidrólise das ligações  $\alpha$  (1,4) que é considerada reação de primeira ordem devido ao baixo grau de substituição. Durante a formação de dextrina, também ocorre a repolimerização, que se inicia quando o conteúdo de água decresce, e pode ser subdividida em dois grupos, reversão e transglucosidação, dependendo das condições de operação (MORESCHI, 2004).

Na presença de água residual, ocorre o processo de reversão que é uma reação entre um grupo aldeído e a hidroxila na posição C6, C3 ou C2 responsável pela eliminação de uma molécula de água que pode iniciar subsequente cisão hidrolítica com a geração de açúcares redutores. Se a taxa de reversão for maior que a taxa de hidrólise, haverá um consumo de funções redutoras e a redução da quantidade de açúcares redutores formados durante a primeira etapa (BEMILLER, 1984).

A reação de transglucosidação consiste na quebra das ligações (C-O-C) e da reassociação de uma unidade de glicose no carbono aldeídico liberado. Esta reação não gera água consequentemente nenhum açúcar redutor aparece. A recombinação da D-glicose é um equilíbrio e, portanto depende da concentração no meio reacional. Assim, o uso de altas concentrações de amido resulta em reduzidos rendimentos de dextrose (BEMILLER, 1984).

O amido apresenta-se encapsulado nos amiloplastos e também ligado à parede celular, de modo que o tratamento enzimático convencional com amilases, não é capaz de remover estes últimos. A aplicação de um tratamento hidrotérmico aparece como uma solução para a hidrólise dos amidos como também de parte do conteúdo de ligninas e hemiceluloses (SAITO, 2005).

O processo de extração supercrítica (ESC) atua como um pré-tratamento para a hidrólise porque a pressão age sobre a matriz sólida, relaxando a estrutura do grânulo de amido, resultando num aumento da taxa de hidrólise (MORESCHI, 2004).

O emprego de temperatura na hidrólise ácida produz, além de açúcares, produtos de degradação da D-glicose como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido levulínico e ácido fórmico, sendo que os dois últimos são obtidos do 5-HMF. Na produção de etanol por fermentação, estes produtos de degradação devem ser extraídos da solução com tolueno ou éter, pois são tóxicos para os microrganismos (KUÇUK & DERMIRBAS, 1997).

De acordo com Yan *et al.* (1996), maiores razões líquido:sólido pode favorecer um aumento no rendimento de açúcares redutores, pois uma menor concentração de açúcares no meio reacional reduz a taxa de decomposição.

Agu *et al.* (1997) combinaram pré-tratamento hidrotérmico com hidrólise ácida de resíduo peneirado de mandioca para produção de etanol. O efeito da combinação deste tratamento foi investigado com diferentes concentrações de ácido sulfúrico a 120 °C com tempo de reação de 30 minutos e obtiveram como resultado um rendimento de 60 %, tendo como melhor concentração ácida de 0,3 M.

An *et al.* (1997) concluíram que altas temperaturas são necessárias para quebrar as ligações glicosídicas, porém monossacarídeos e oligossacarídeos são mais susceptíveis à decomposição em condições mais suaves. Portanto, maiores rendimentos poderiam ser obtidos se os açúcares produzidos fossem retirados do meio reacional tão logo fossem formados, evitando assim a sua degradação.

Fontana *et al.* (2001) demonstraram o processo de dextrinização, oligomerização ou monomerização da fécula de mandioca utilizando o ácido fosfórico como catalisador ácido e observaram que o aumento progressivo da força ácida favoreceu a monomerização para qualquer condição de termopressurização. O melhor resultado apresentado foi 60,7 % de

glicose, 17,2 % de maltose e 22,1 % de maltotriose obtido a 160 °C, 5,1 atm e 425 mg de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> /g de amido após 10 minutos de reação.

Woiciechowski *et al.* (2002) estudaram a hidrólise ácida e enzimática do bagaço de mandioca relacionando a eficiência de recuperação de açúcar redutor com os custos de operação. As condições de trabalho foram 5 g do farelo / 50 mL da solução ácida, o ácido clorídrico nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 %; temperatura de 100, 120 e 130 °C e tempo de reação de 5, 10 e 15 minutos. A conclusão foi de um rendimento de 94,5 % de açúcares redutores no tratamento ácido na condição de temperatura 120 °C, tempo de reação de 10 minutos e concentração ácida de 1 % e um rendimento de 97,3 % para o tratamento com ação enzimática, porém em relação ao tempo, uma batelada da hidrólise ácida gasta 10 minutos, mais o tempo para aquecer e resfriar o reator e custa US\$ 34.27. Uma batelada da hidrólise enzimática precisa de 25 horas e 20 minutos, mais o tempo para aquecer e resfriar o reator e custa US\$ 2470.99.

Moreschi (2004) em seus estudos da hidrólise do bagaço de gengibre observou que a 176 °C o grau de hidrólise do amido foi muito menor quando comparada com a reação a 188 e 200 °C. O máximo grau de hidrólise obtido a 176 °C foi 46,1 % de açúcares redutores após 11 minutos de reação, e a 188 e 200 °C, os maiores valores de grau de hidrólise obtidos foram de 76,6 e 97,1 %, respectivamente, após 15 minutos.

Bringhenti (2004) avaliou a utilização dos resíduos da agroindustrialização da mandioca como fonte de carbono para fermentação alcoólica, buscando um etanol, que possua qualidades adequadas para uso na indústria alimentícia e observou-se que os melhores resultados foram obtidos com mel residuário na concentração de 20 %, resultando na produção de 47,42 % de etanol, a partir de um consumo de 56,3 % do ART. No destilado final verificou ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol, e ácidos carboxílicos e presença de furfuraldeído e formaldeído com concentrações de 0,01 e 0,004 g/L respectivamente.

Oomori *et al.* (2004) estudaram a hidrólise de dissacarídeos contendo resíduos de glicose em água subcrítica e concluíram que a susceptibilidade à hidrólise depende do tipo de monossacarídeo constituinte e do tipo de ligação glicosídica envolvida.

Bringhenti & Cabello (2005) verificaram a qualidade do álcool produzido a partir de hidrolisados de resíduos amiláceos de farinha, aditivados com mel residuário da fabricação da cana de açúcar, observando a ausência de alcoóis superiores, metanol, ácidos carboxílicos, e ausência de aldeído fórmico nas baixas concentrações de aldeídos totais. O álcool produzido apresentou concentração isotópica de 97 % de C3 e 3 % de C4.

Saito (2005) desenvolveu uma metodologia adequada para o tratamento do farelo de mandioca e os melhores resultados foram obtidos para as seguintes condições de tratamento: 35 minutos; 140 °C; concentração do ácido sulfúrico de 2,5 % (m/s); umidade de 90,5 % e rotação de 50 rpm obtendo uma concentração de glicose de 7,3 %; de 100 mg/L de compostos fenólicos e rendimento de recuperação do amido residuário de 102,9 %. Os ensaios de fermentabilidade com os hidrolisados mostraram que a concentração de fenólicos (0,06 %) não inativam o catalisador biológico e a fermentação ocorreu com a produção de 2,9 % de etanol com fator de conversão de 0,46.

Srinorakutara *et al.* (2006), estudaram o pré-tratamento dos resíduos da mandioca na produção de açúcares redutores utilizando 50 g do farelo de mandioca e 100 mL de água (1:2 p/v) em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 - 5,0 M) a 60 - 120 °C por 30 minutos. O estudo mostrou que o hidrolisado em 0,6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 120 °C por 30 min deu o máximo de açúcar reduzindo em 6,1 % (p/v).

A hidrólise do amido de tubérculos de batata doce por HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes proporções de material vegetal em solução de ácida foi investigada por Tasic *et al.* (2009). O maior rendimento de dextrose equivalente (94 %) e 0,04 g/L de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) foram conseguidos com HCl 1 M, a 0,089 min<sup>-1</sup> e na proporção de 1:2 (p/v). A produção de etanol de 31 g/L foi obtida na fermentação de hidrolisado preparado sob as condições ótimas de hidrólise por leveduras de panificação comercial a 28 °C durante cerca de 18 horas.

Gaewchingduang & Pengthemkeerati (2010) utilizou uma suspensão de farelo de mandioca 2 % diluída em ácidos (ácido sulfúrico e ácido fosfórico) de diferentes concentrações (0,05 - 0,5 M) que foi hidrolisada em autoclave a vários níveis de temperatura (115 - 130 °C) e tempo de reação (15 - 90 minutos), obtendo a maior taxa de açúcares redutores com 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 120 °C por 60 min ou em 130 °C por 30 min. Neste

estudo, o ácido sulfúrico teve uma maior capacidade de hidrolisar o farelo de mandioca que o ácido fosfórico.

Hashem & Darwish (2010) utilizaram o fluxo de resíduos de amido de batata produzidos durante a fabricação de chips como fonte econômica para a biomassa e produção de bioetanol por duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (y-1646 e um comercial). Os resultados demonstraram que H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 % a 100 °C por 1 hora foi suficiente para hidrolisar o 100 % do amido. A produção máxima de etanol (5,52 g L<sup>-1</sup>) foi obtida a 35 °C por *S. cerevisiae* Y-1646 após 36 h, quando ZnCl<sub>2</sub> (0,4 g L<sup>-1</sup>) foi adicionado. Adição de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio não afetou significativamente crescimento ou a produção de etanol.

#### **2.4.1.2 Hidrólise da lignocelulose**

Um dos maiores problemas associados na hidrólise ácida da lignocelulose é a pobre fermentabilidade do hidrolisado. A lignocelulose hidrolisada e a concentração de açúcares no hidrolisado são produtos dependentes da hidrólise (LARSSON *et al.*, 1999).

Os inibidores no hidrolisado, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural dificultam a fermentabilidade quando estão em concentração por volta de 10 g/L (TAHERZADEH, 1999).

Durante o tratamento envolvendo ácido ou base, as pentoses e as hexoses formadas pela hidrólise da celulose e hemicelulose podem favorecer a formação de: furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido levúrico e ácido fórmico como outras substâncias, sendo os três principais grupos de compostos inibidores formados no pré-tratamento são: ácidos alifáticos, derivados de furanos e fenólicos (SÖDERSTRÖM *et al.*, 2003).

Cuzens & Miller (1997) a hidrólise ácida é um processo econômico na conversão de celulose em etanol combustível. Trabalhando nas condições 10 - 30 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 170 - 190 °C e relação 1:1,6 (sólido:líquido) observaram uma redução no gasto de energia em torno de 8 %, maior facilidade em manusear e eficiência no uso, maior economia em reagentes.

Muitos métodos tecnológicos de conversão dos produtos da biomassa lignocelulósica foram desenvolvidos e propostos como, por exemplo, tratamento biológico (enzimas) e tratamento físico-químico (água quente) (MOCHIDZUKI *et al.*, 2003).

A hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ser feita usando ácido ou vapor. Hidrólise a vapor pode ser usada sob forma de alta pressão, denominado explosão que é o processo no qual a biomassa é tratada com alta pressão sob condição específica e subsequente extinção da pressão atmosférica por expansão adiabática do material contida no reator. Este método oferece vantagens, uma delas é o eficiente fracionamento de três componentes do resíduo da lignocelulose (SAITO, 2005).

O uso de resíduos de extração supercrítica aumenta o rendimento da hidrólise uma vez que a etapa de extração atua como um pré-tratamento através da relaxação da estrutura amilácia-celulósica, facilitando a hidrólise (MORESCHI, 2004).

A hemicelulose é formada em sua maioria por monômeros de xilose, enquanto a celulose é quase inteiramente um polímero de glicose. As pentoses produzem furfurais, e as hexoses, os hidroximetilfurfurais por hidrólise, sendo que a formação de hidroximetilfurfural da D-frutose é mais rápida e apresenta maior rendimento do que da D-glicose (NELSON & THEANDER, 1988).

As hemiceluloses, geralmente, são menos resistentes a hidrólise que a celulose. Entretanto, o comportamento cinético da reação ainda não é completamente entendido. A hidrotermólise da lignina exige elevadas temperaturas devido à sua estabilidade térmica (BOBLETER, 1994).

A hidrólise favorece a quebra das ligações éter-éster, pela adição de uma molécula de água para cada ligação quebrada. Os grupos acetil na hemicelulose são conectados às pentoses por ligações éster: para o caso da lignina, além das ligações éter, as ligações C-C também ocorrem entre as unidades de fenilpropano (BOBLETER, 1994).

Aproximadamente metade de todas as ligações do monômero fenilpropano, na lignina é ligação éter, formando estruturas macromoleculares estáveis que podem também ser degradadas por hidrólise (BOBLETER, 1994). O processo de extração da lignina é efetivo quando a temperatura é maior que a temperatura de seu ponto de transição vítrea, próximo a 175 °C (RUBIO *et al.*, 1998).

A hidrólise de celulose com água subcrítica resulta em pentoses e hexoses de variados graus de polimerização, com inúmeros usos nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos, produção de etanol, entre outras, incluindo matérias-primas de síntese de derivados de petróleo (MORESCHI, 2004).

Mok & Antal (1992) citados por Savage *et al.* (1995) estudaram a conversão da celulose em glicose usando água como solvente em temperaturas próximas da crítica e 340 bar; e consideraram que as vantagens do uso de condições próximas às da crítica são a baixa demanda de calor e a oportunidade de ter catálise ácida com baixas concentrações de ácido, obtendo 55 % de rendimento de glicose na hidrólise ácido-catalisada em temperaturas próximas de 220 °C.

Sasaki *et al.* (1998) estudaram a hidrólise da celulose em água sub e supercrítica em regime contínuo a 290 - 400 °C e 250 bar e tiveram maiores rendimentos de produtos de hidrólise em meio supercrítico (75 %).

A taxa de conversão de glicose ou oligômeros é muito mais rápida que a taxa de hidrólise da celulose em temperaturas inferiores a 290 °C, diminuindo o rendimento dos produtos de hidrólise. Próximo ao ponto crítico, a taxa de hidrólise torna-se mais rápida que a taxa de decomposição da glicose ou oligômeros (Sasaki *et al.*, 1998).

Rubio *et al.* (1998) estudaram o fracionamento de lignocelulósicos (corn stalk) a 200 - 220 °C e 120 bar, numa suspensão aquosa (4 % m/m), conseguindo solubilizar a maioria da hemicelulose e obtendo açúcares poliméricos e monoméricos e seus produtos de degradação, além do resíduo sólido de celulose - lignina.

Garrote *et al.* (2001) estudaram a auto-hidrólise da espiga de milho a 145 - 190 °C durante 0 - 12,3 horas numa taxa sólido:líquido de 8 - 10 kg/kg e obtiveram xilooligossacarídeos, xilose e furfural. Os parâmetros cinéticos foram calculados considerando reações de primeira ordem, pseudo-homogêneas, paralelas e consecutivas que envolveram a degradação das xilanas susceptíveis para xilooligossacarídeos de alta massa molecular, a hidrólise destes compostos para xilooligossacarídeos de baixo peso molecular (xilose e furfural), e posterior desidratação destes compostos.

Aguilar *et al.* (2002) produziram xilitol através de tratamento de materiais lignocelulósicos de baixo custo como, por exemplo, bagaço de cana de açúcar utilizando



uma temperatura de 100 - 128 °C e concentração ácida de 2 - 6 %. A produção de xilitol é de grande interesse, pois sua vantagem sobre a glicose ou sacarose está em ser anticarcinogênico e possuir baixo valor calórico.

Utilizando a palha de trigo, Curreli *et al.* (2002) recuperam xilose cristalina através do pré-tratamento realizada em duas fases; sendo o primeiro pré-tratamento para hidrolisar a hemicelulose sendo tratado com ácido sulfúrico a 2 % de concentração numa temperatura de 90 °C com o tempo de 2 - 24 horas de incubação obtendo o melhor tempo acima de 12 horas; o segundo pré-tratamento utilizaram para remover a lignina hidróxido de sódio a 1 % contendo peróxido de hidrogênio a 0,3 % com tempo de reação de 6 - 24 horas e, por fim o liquor obtido é submetido a uma hidrólise enzimática para produção de glicose e xilose.

Laser *et al.* (2002) fizeram comparações entre tratamento com água quente e pré-tratamento tipo “*steam explosion*” em bagaço de cana de açúcar para bioconversão etanólica. O tratamento a água quente com simultânea fermentação produz um rendimento de 80 % não produzindo hidrolisados com inibidores de fermentação da glicose; já o pré-tratamento “*steam explosion*” inclui reatividade das fibras produzindo açúcares derivados da celulose e hemicelulose podendo superar a 90 % de rendimento, porém o seu hidrolisado possui inibidores que influenciam na fermentação da glicose.

Carvalho *et al.* (2004) avaliaram a eficácia do ácido fosfórico para liberação de xilose hemicelulose do bagaço de cana e a concentração máxima de xilose no hidrolisado (17,1 g.dm<sup>-3</sup>) foi alcançado quando o bagaço foi tratado a 160 °C por 60 min, utilizando 70 mg de ácido fosfórico por grama de bagaço seco.

Jeong *et al.* (2010) investigaram os efeitos da concentração do ácido sulfúrico, temperatura e tempo de reação para o pré-tratamento da palha de colza. As condições ideais obtidas foram: concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,76 % e temperatura de 152,6 °C com um tempo de reação de 21 min. Sob essas condições ideais, 85,5 % do açúcar total foi recuperada após hidrólise ácida.

#### 2.4.2 Processo Fermentativo

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

O processo de produção do etanol atualmente praticado no Brasil envolve o reciclo das leveduras, e com isso ocorre o reciclo de contaminantes causando diversos distúrbios tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido a toxinas lançadas no meio pelo contaminante (ALTHERTUM *et al.*, 1984), fermentações secundárias oriundas da atividade desses microrganismos contaminantes (BOVI & MARQUES, 1982), além do problema de floculação das células de levedura provocada tanto por bactérias como por leveduras.

O processo contínuo, além de possibilitar uma redução no tempo de fermentação, causa um menor consumo de substrato para o crescimento celular, sendo quase todo ele utilizado para a conversão em álcool, uma vez que já se dispõe de uma concentração elevada de células no início da fermentação. Neste processo, o inóculo já preparado no fundo do fermentados recebe o mosto em filete contínuo até o enchimento da dorna (CYSEWSKI & WILKIE, 1978).

O processo contínuo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado e reduzido o tempo de limpeza e sanitização das dornas (CYSEWSKI & WILKIE, 1978).

As fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição, além de exigir um conhecimento apurado para otimizar as condições de processo para atingir o rendimento desejado (INGLEDEW, 2005).

O processo de batelada alimentada é útil para o estudo da cinética de processos fermentativos, pois permite a manutenção de baixos níveis de substrato por longo período de tempo, que é favorável à estimativa de parâmetros cinéticos; permite manter concentração celular constante e controlar a velocidade de crescimento em condições transientes (OLIVA-NETO, 1995).

A fermentação etanólica com açúcares em concentrações excedentes a 27 % (p:v) são lentas e poucos sacarídeos são convertidos em açúcares (BAFRNCOVÁ *et al.*, 1999). Altas concentrações de açúcares no mosto fermentativo são responsáveis pela parada ou diminuição da fermentação devido ao aumento da pressão osmótica e da alta toxicidade do etanol para as células de leveduras (BISSON e BUTZKE, 2000; MALACRINÒ *et al.*, 2005). Segundo Oliva-Neto (1995) a condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar na fase inicial da fermentação.

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura. (GHOOSE e TYAGI, 1979). A tolerância a altas concentrações de etanol é dependente da linhagem, sendo que para a maioria das linhagens tolerantes a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10 % (p:v) e que proporciona a produção de etanol no máximo de 20 % (p:v).

Segundo Larsson *et al.* (1999) o ácido fórmico, que é obtido da desintegração do furfural quando a hidrólise ocorre sob condições ácidas e temperaturas elevadas apresenta maior potencial inibidor sobre a atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* que os ácidos acético e levulínico. Relatam também que ácido fórmico em concentração de 0,48 mM causa redução de 15 - 22 % no rendimento em etanol, quando comparado com outras fermentações contendo concentrações equimolares dos ácidos levulínico e acético no meio de fermentação.

Taherzadeh (1999) descreve alguns inibidores para *S. cerevisie*, levedura utilizada para fermentação etanólica. O efeito do ácido acético depende de sua concentração máxima que é de 5 g/L, já na concentração de 1 g/L não possui grande influência na fermentação do produto. O composto formado pela degradação da hexose e da pentose, furfural e hidroximetilfurfural, inibe a levedura quando estão em concentração de 4 g/L.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Mandioca

O farelo de mandioca foi fornecido pela empresa Halotek Fadel S/A, localizada em Palmital/SP, e embalado em sacos plásticos de PVC. Foram armazenados em local arejado, na ausência de luz, para posterior utilização nos ensaios. A Figura 2 ilustra a matéria-prima, mandioca, utilizada nos experimentos.



**Figura 2.** Matéria-prima utilizada nos experimentos.

#### 3.2 Microrganismo

No processo fermentativo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* M-26, cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial da FCL - UNESP - Assis/SP. A mesma foi isolada do processo fermentativo na Usina Nova América, município de Tarumã, Estado de São Paulo. As cepas foram mantidas a -75 °C em tubos tipo eppendorfes com meio YM (com 10 % v/v de glicerol) em pH 5.0.

### 3.3 Planejamento experimental

Os experimentos foram realizados através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta e os dados foram tratados com auxílio do programa computacional STATISTICA, StatSoft - versão 7.0.

Foi realizado um modelo planejamento experimental fatorial completo  $2^2$ , com 3 replicatas no ponto central para os tratamentos de hidrotermólise com ácido sulfúrico e com ácido fosfórico, objetivou avaliar as melhores condições de trabalho em relação às variáveis dependentes quais sejam: concentrações de açúcares redutores totais e glicose. As variáveis independentes foram tempo de processo (minutos) e concentração do catalisador (pH).

Os valores reais de cada nível das variáveis independentes estão especificados conforme mostra a Tabela 2. As condições experimentais com os valores codificados dos níveis utilizados em cada ensaio são mostradas na Tabela 3.

**Tabela 2.** Valores decodificados das variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial.

Variável	Nível		
	-1	0	+1
pH	0,5	1,0	1,5
Tempo (min)	30	60	90

**Tabela 3.** Planejamento fatorial codificado e decodificado para estudo do efeito do tempo de processo e pH no rendimento do processo de hidrólise.

ENSAIOS	pH	pH	Tempo	Tempo (min.)
1	-1	0,5	-1	30
2	1	1,5	-1	30
3	-1	0,5	1	90
4	1	1,5	1	90
5	0	1,0	0	60
6	0	1,0	0	60
7	0	1,0	0	60

### 3.4 Hidrotermólise ácida do amido

O processo de hidrólise ácida foi realizado na presença dos catalisadores ácido sulfúrico P.A. ( $H_2SO_4$ ) 50 % (v/v) e ácido fosfórico P.A. ( $H_3PO_4$ ), 50 % (v/v), em diferentes concentrações (pH) e tempos de reação (minutos) (Tabela 2), a  $123 \pm 2$  °C e 0.5 atm, em autoclave. Os testes foram iniciados com uma suspensão de farelo e água a 5 % (p/v).

### 3.5 Tratamento do hidrolisado para processo fermentativo

Após o tratamento de hidrólise, o liquor foi filtrado em tecido de polipropileno com vazamento de 1  $\mu$ m e seu volume medido. Em seguida adicionado uma suspensão de óxido de cálcio (CaO) a 50 % sob agitação contínua, até o pH atingir a faixa entre 5,0 - 5,3 unidades com o objetivo de torná-lo aproveitável no processo fermentativo.

Para formulação do meio de fermentação o material obtido a partir da hidrólise foi neutralizado e submetido a um vaporizador a 50 °C, para obtenção de um meio concentrado com 12 % de açúcar redutor, que foi acrescido de extrato de levedura 0,5 %, sulfato de amônia 0,1 %;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0,114 %;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,024 %;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,00104 %;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,0028 % e uréia 0,1 %, em pH 5.0.

### 3.6 Ensaios fermentativos

Para o processo fermentativo, inóculo da levedura *S. cerevisiae* M-26 foi preparado assepticamente em meio contendo (%): sacarose 2,0 (Difco P.A.), extrato de levedura 1,0 (Difco), sulfato de amônia 0,1 (Labsynth), Fosfato bipotássico  $3H_2O$  0,1140 (Labsynth), Sulfato de magnésio  $7H_2O$  0,024 (Labsynth), Sulfato de manganês  $H_2O$  0,00104 (Labsynth), Sulfato de zinco  $7H_2O$  0,0028 (Labsynth) (pH 5.0).

A obtenção do inóculo foi feita através de sucessivos cultivos no meio formulado em tubos de cultura e posteriormente em frascos de Erlenmeyers à temperatura de 30 °C, sob agitação constante de 135 rpm em agitador orbital com refrigeração, marca Tecnal, por 24 horas. Após atingir a concentração celular, aproximadamente, de  $1,2 \times 10^6$  células  $mL^{-1}$ , as leveduras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada, marca Fanen, durante 25 min a 3500 xg.

A fermentação alcoólica foi conduzida pelo processo de batelada alimentada (fed-batch) com reciclo de células. Para iniciar a fermentação, 27 g de biomassa úmida foram inoculadas em 75 mL de água destilada em Erlenmeyer de 500 mL. As leveduras foram alimentadas com 25 mL do meio de fermentação nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas de fermentação. O volume final de cada ciclo de fermentação foi de 225 mL. Os frascos de Erlenmeyers foram submetidos à agitação constante de 80 rpm (Agitador Tecnal TE421), a 32 °C por 12 horas. O processo foi interrompido após 12 horas. As leveduras foram centrifugadas (centrífuga refrigerada - Fanen) a 4000 xg a 4 °C por 30 min e as amostras do vinho deleverado foram congeladas para análises posteriores.

### **3.7 Análises Físico-Químicas**

#### **3.7.1 Caracterização do farelo de mandioca**

O teor de umidade do farelo foi determinado usando-se estufa com circulação de ar a 105 °C até peso constante, de acordo com o método 31.1.02 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). Para a determinação do teor de cinzas (%), matéria graxa (%), nitrogênio total (%), fibras (%) empregou a metodologia da AOAC (1995). O teor de proteína bruta foi determinado convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25 (AOAC, 1995).

A determinação de açúcares redutores (AR) foi segundo Nelson (1944) e Somogy (1945). O teor de amido foi calculado pela diferença dos outros componentes da amostra (umidade, cinzas, proteínas, matéria graxa, fibras e açúcar solúvel total), segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1976).

#### **3.7.2 Caracterização do hidrolisado**

Os produtos de hidrólise foram caracterizados com relação à quantidade de açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945), glicose (Kit Glucos 500) e hidroximetilfurfural (HMF).

Na determinação de AR utilizou-se a curva padrão a partir das concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de glicose e a leitura das absorbâncias das amostras foi através do espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro) a 535 nm.

A concentração de hidroximetilfurfural (HMF) solúvel em água foi quantificada a partir da análise indicada pela AOAC (1995), método espectrofotométrico (UV - Vis) 980.23.

O pH foi determinado em pHmetro Tecnal tec-2 (AOAC, método 32.1.20) [AOAC, 1997] e teor de sólidos solúveis (Brix), determinado em refratômetro.



O material hidrolisado foi quantificado quanto à massa residual de farelo. Amostras de 100 mL foram filtradas e o teor de umidade do material retido determinado de acordo com o AOAC (1995), método 31.1.02.

### **3.7.3 Rendimento da hidrólise**

O rendimento do processo de hidrólise foi definido como a porcentagem de amido removido do farelo e transformado em açúcar redutor (SAITO, 2005). O rendimento em porcentagem (%) foi calculado de acordo com a Equação 1.

#### **Equação 1:**

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Conc. de AR no hidrolisado (g)} \times 100}{\text{Conc. amido no farelo (g)} + \text{Conc. AR inicial (g)}}$$

### **3.7.4 Determinação da massa seca**

Para determinar a massa celular produzida na fermentação foi utilizado o método gravimétrico em estufa com circulação de ar a 105 °C, que consiste na pesagem do material seco conforme a metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

### **3.7.5 Determinação de etanol**

A concentração do etanol foi determinada por meio de densímetro (Density Meter DMA 4500) após a destilação do vinho em microdestilador de álcool (Tecnal TE-012). A partir do etanol e açúcar redutor total (ART) foram calculados o rendimento alcoólico (Equação 2) e a produtividade de etanol (Equação 3) (DORTA *et al.*, 2006).

### **Equação 2:**

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{\text{Conc. de etanol produzido (g/L)} \times 100}{\text{Conc. de ART inicial (g/L)} \times 0,511}$$

Onde, 0,511= coeficiente de transformação de ART em etanol.

### **Equação 3:**

$$\text{Produtividade (P)} = \frac{\text{Conc. de etanol produzido (g/L)}}{\text{Tempo de fermentação (h)} \times V (L)}$$

Onde, P = produtividade do etanol expressa em g/ L.h

### **3.7.6 Determinação de acidez**

A determinação da acidez total foi expressa em ácido láctico (AOAC, método 945.08, 2010). A quantidade de 5 mL de uma amostra foi completada para 50 mL com água destilada e, em seguida, titulada com hidróxido de sódio a 0,1 N até a mudança para a coloração rosa (pH 8,3). Para a padronização de NaOH foi usado o biftalato de potássio (dessecado a 120 °C / 2 horas antes do uso). O cálculo da acidez total (g de ácido láctico / L) foi feito através da Equação 4 (OLIVA-NETO, 1995).

### **Equação 4:**

$$\text{Acidez total} = \frac{\text{Volume de NaOH 0,1N (mL)} \times 9,008 \times \text{fator de correção NaOH}}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

### **3.8 Análises Microbiológicas**

#### **3.8.1 Viabilidade celular**

A porcentagem de células vivas (viabilidade) em relação ao total de células foi determinada por do microscópio óptica em câmara de Neubauer. Para tanto, as células de leveduras foram coradas com solução de eritrosina (diluição 5000 x), sendo tomado como parâmetro, amostra do final de cada ciclo fermentativo.

Os resultados foram dados em porcentagem de células vivas (células descoradas) e porcentagem de brotos vivos (descolorados) em função do número total de células contadas.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização do farelo de mandioca**

O farelo utilizado no trabalho apresentou baixo grau de umidade (13,74 %) e está de acordo com a legislação brasileira que determina o máximo de 14 % de umidade para produto rico em amido (BRASIL, 1978). Os resultados das análises estão descritos na Tabela 4.

O farelo da mandioca antes do tratamento ácido hidrotérmico apresentou concentração de 2,57 % de proteínas e 1,18 % de matéria graxa. Estes valores são relativamente baixos frente a 60,48 % de amido, caracterizando um material com alto teor energético.

O principal componente, amido, foi de aproximadamente 60,48 % e o segundo maior componente foi em fibra de 20,01 %. O teor de amido no farelo está dentro da média encontrada por diferentes autores que apresentaram teores que variaram de 47,1 % (RAUPP *et al.*, 1999) a 65,37 %. (SRINORAKUTARA *et al.*, 2006).

**Tabela 4.** Composição físico-química do farelo de mandioca.

<b>Composição</b>	<b>Resultados<sup>1</sup></b>
Umidade (%)	13,74 ± 0,035
Carboidrato (%)	67,20 ± 0,826
Fibra bruta (%)	20,01 ± 1,000
Proteína bruta (%)	2,57 ± 0,104
Matéria Graxa (%)	1,18 ± 0,030
Cinzas (%)	3,78 ± 0,115
pH	5,0 ± 0,100

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

Wosiacki & Cereda (1985), Rivera *et al.* (1993) e Leonel *et al.* (1999) encontraram, respectivamente, em média 74,21 %, 83,02 % e 80 % de amido e o seu elevado teor no farelo significa ineficiência no processo de extração do amido da mandioca, visto que algumas indústrias brasileiras conseguem gerar um resíduo com 50 - 65 % de amido.

Os valores obtidos na determinação de umidade, carboidratos e proteínas foram próximos aos obtidos por Cereda (1994) que encontrou 11,18 % de umidade, 65,51 % de carboidrato e 2,32 % de proteína bruta.

Os dados obtidos na composição centesimal do farelo (Tabela 4) mostram que este apresentou composição semelhante à citada por CEREDA (1996), que cita como média de composição de farelos originados em diversas indústrias brasileiras: 15 % de fibras, 1,5 % cinzas, 1 % matéria graxa, pH 4 - 6. Os valores de pH e acidez são bastante variáveis, devido à fermentações naturais que o resíduo úmido pode sofrer.

Quanto aos resultados de teor de fibras (20,01 %), os mesmos foram similares aos obtidos por Pandey *et al.* (2000), que determinaram 21,10 %. Porém apresentou um baixo teor quando comparado com o valor (43,10 %) encontrado por Raupp *et al.* (1999). A

divergência em relação aos resultados segundo Raupp & Sgarbieri (1996) pode ser atribuída ao uso de diferentes métodos analíticos.

Raupp & Sgarbieri (1996) utilizou o método enzimático que quantifica a totalidade dos componentes de natureza fibrosa. O método de fibra bruta (AOAC, 1984) aplicado no presente trabalho, consiste no tratamento ácido e alcalino da amostra e quantifica quase a totalidade de celulose, algumas hemiceluloses e a lignina mas não quantifica substâncias pécicas, gomas, mucilagens e, portanto, subestima a fibra alimentar total.

A composição físico-química do farelo de mandioca sofre variação devido, provavelmente, a variedade de mandioca das diferentes regiões e variações naturais, como cultivar, idade fisiológica, clima e tipo de solo. Além destes fatores, o nível tecnológico da feccularia, a mão de obra diferenciada e metodologia de análise empregada também são responsáveis por tais diferenças.

#### **4.2 Caracterização do hidrolisado**

Nos experimentos de caracterização do hidrolisado utilizou-se uma suspensão de farelo e água na proporção de 5 % (p:v). Um dos principais problemas no processo de produção de etanol de farelo é a concentração de sólidos. Em concentrações de sólidos acima de 10 % tem-se baixo rendimento causado por problemas de transferência de calor, homogeneização da pasta e sacarificação não uniforme. Segundo Yan *et al.* (1996), maiores razões líquido:sólido poderiam favorecer um aumento no rendimento de açúcares redutores pois uma menor concentração de açúcares no meio reacional reduz a taxa de decomposição.

Os valores das análises de composição da suspensão de farelo de mandioca utilizada nos processos de hidrólise ácida estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Análise da suspensão inicial de farelo de mandioca e água (5 %) utilizado para o processo de hidrólise.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados<sup>1</sup></b>
Amido (%)	3,02 ± 0,031
Açúcares Redutores (%)	0,017 ± 0,002
Glicose (%)	0,010 ± 0,001
Brix	2,712 ± 0,272
pH	5,0 ± 0,252

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

#### **4.2.1 Catalisador ácido sulfúrico**

##### **4.2.1.1 Açúcares redutores**

Os valores de açúcares redutores (AR) e os rendimentos (Equação 1) obtidos após os diferentes tratamentos de hidrólise empregando como catalisador o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) estão apresentados na Tabela 6.

Os dados mostram que o tratamento hidrotérmico e o emprego de ácido sulfúrico como catalisador foram adequados para hidrolisar o amido presente no farelo de mandioca.

A maior concentração de AR (2,93 %) e o valor máximo de rendimento de 96,48 % após o processo de hidrólise referem-se ao tratamento 2 (90 min., pH 0,5, Tabela 6). Portanto, o comportamento do rendimento da taxa de hidrólise do processo apresenta dependência em relação às variáveis tempo de reação e pH. Assim, o rendimento aumentou com o aumento do tempo de reação e diminuição do pH, sendo que este comportamento facilitou a dissociação (ionização) da molécula de água e acelerou a hidrólise.

**Tabela 6.** Valores de açúcares redutores (AR) e rendimentos nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Ensaio	Tempo (min)	pH	mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>1</sup> 50 %	AR <sup>1</sup> (%)	Rendimento (%)
1	30	0,5	37,6 ± 7,767	2,04 ± 0,025	67,17
2	90	0,5	37,6 ± 7,767	2,93 ± 0,015	96,48
3	30	1,5	6,56 ± 0,602	0,58 ± 0,020	19,09
4	90	1,5	6,56 ± 0,602	1,52 ± 0,030	50,05
5	60	1,0	11,0 ± 1,732	1,98 ± 0,025	65,19
6	60	1,0	11,0 ± 1,732	2,11 ± 0,045	69,48
7	60	1,0	11,0 ± 1,732	2,08 ± 0,083	68,49

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

A conversão do amido foi acima de 60 % nos tratamentos em pH 0,5 e 1,0, o que demonstra que o farelo de mandioca é uma boa fonte alternativa à cana-de-açúcar, para a produção de açúcares fermentescíveis e, posteriormente, produção de etanol.

A quantidade de ácido sulfúrico utilizada para se alcançar o pH 0,5 foi cerca de três vezes maior quando comparada com o pH 1,0. Assim, os tratamentos em pH 0,5, mesmo produzindo um maior rendimento em açúcares redutores são menos viáveis economicamente se comparado ao pH 1,0.

No presente trabalho foi constatado que após 30 minutos de reação em pH 0,5, o rendimento de açúcares redutores foi 67,72 % e este resultado são semelhantes aos encontrados por Agu *et al.* (1997) que obtiveram um rendimento de 60 % na concentração ácida de 0,3 M, a 120 °C após 30 minutos de reação.

Gaewchingduang & Pengthemkeerati (2010) obtiveram maior taxa de açúcares redutores (384 mg.g<sup>-1</sup>) utilizando 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 120 °C por 60 minutos ou em 130 °C por 30 minutos.

Os rendimentos de açúcares redutores obtidos nos diferentes tratamentos (Tabela 6) foram inferiores ao apresentado por Woiciechowski *et al.* (2002), que obteve 94,5 %, utilizando 1 % de ácido clorídrico a 120 °C por 10 minutos. Assim, pode-se dizer que o ácido clorídrico apresenta um maior poder catalítico que o ácido sulfúrico.

A Tabela 7 e Figura 3 apresentam os efeitos lineares das variáveis (tempo de reação e pH) bem como as interações dos parâmetros sobre a produção de açúcares redutores após o processo de hidrólise, ao nível de 95 % de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 7.** Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

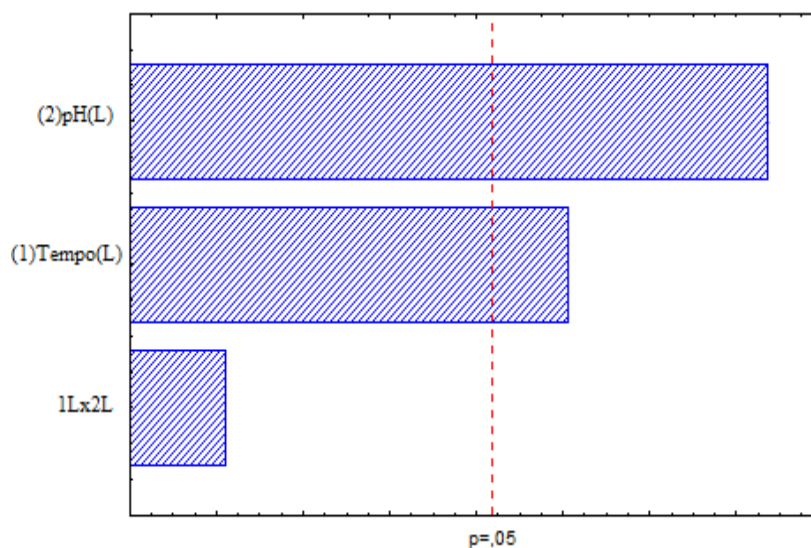
Parâmetros	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,891	0,085	22,187	0,0002	1.620	2.162
1- Tempo (L) *	0,915	0,225	4,056	0,0269	0.197	1.632
2- pH (L) *	-1,435	0,225	-6,362	0,0078	-2.152	-0.717
1 x 2	0,025	0,225	0,110	0,9187	-0.692	0.742

\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear  
R = 0,9746

O coeficiente de determinação (R) obtido foi de 0,9746, ou seja, 97,46 % da variação da resposta é explicada pelo modelo, onde apenas 2,54 % se atribuiu aos resíduos, portanto, o modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

Analisando a Tabela 8 observa-se que o tempo de reação apresentou efeito positivo significativo ( $p \leq 0,05$ ) no processo de hidrólise do farelo de mandioca para obtenção de açúcares redutores. A influência de cada parâmetro pode ser observada, de uma maneira mais clara, através do gráfico de Pareto disposto na Figura 3.





**Figura 3.** Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de AR (%) do hidrolisado utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

O pH foi o parâmetro que mais influenciou na resposta, entretanto, foi um efeito significativo negativo, indicando que a diminuição do pH (1,5 a 0,5) implicou num maior aumento na obtenção de AR a partir do farelo de mandioca utilizando como catalisador o  $H_2SO_4$  a 50 %.

A interação entre as variáveis (tempo x pH) não foi estatisticamente significativa a 95 % de confiança ( $p \geq 0,05$ ). Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior taxa de hidrólise em relação à obtenção de açúcares redutores estão relacionadas com um tempo de reação maior e um pH menor, ou seja, 90 minutos de reação a pH 0,5.

Os resultados obtidos corroboram com os apresentados por Hashem & Darwish (2010), que apontam o pH do meio como a variável de maior influência nas reações de hidrólise do amido para obtenção de açúcares redutores.

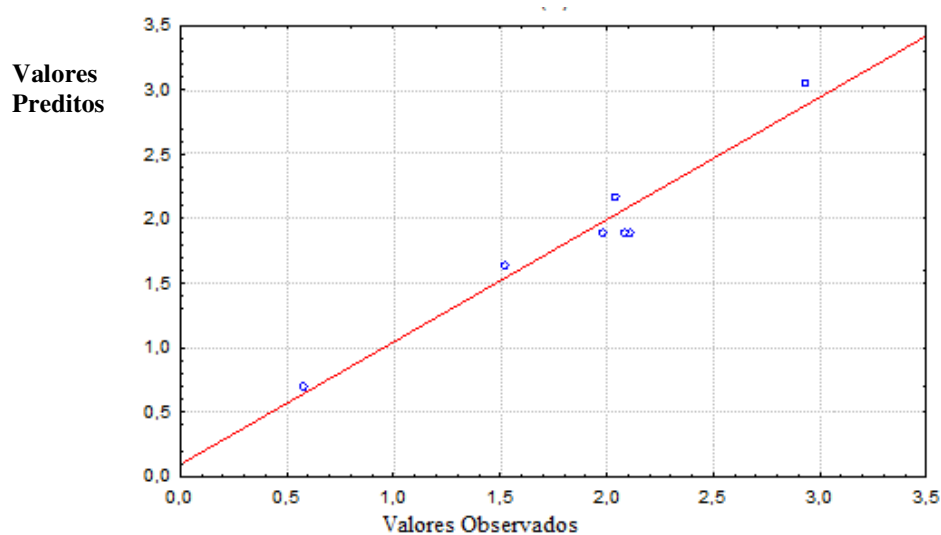
A Tabela 8 e a Figura 4 apresentam os valores observados e preditos obtidos no processo de hidrotermólise ácida para obtenção de AR.

A análise dos resíduos é um parâmetro de importância fundamental ao se avaliar a qualidade do ajuste de um modelo e valores residuais altos indicam má qualidade no ajuste (BARROS NETO *et al.*, 2001).

**Tabela 8.** Valores observados, preditos e resíduos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Ensaio	Observado	Predito	Resíduo
1 (30 min./pH 0,5)	2,040	2,164	-0,124
2 (90 min./pH 0,5)	2,930	3,054	-0,124
3 (30 min./pH 1,5)	0,580	0,704	-0,124
4 (90 min./pH 1,5)	1,520	1,644	-0,124
5 (60 min./pH 1,0)	1,980	1,891	0,088
6 (60 min./pH 1,0)	2,110	1,891	0,218
7 (60 min./pH 1,0)	2,080	1,891	0,188

O ajuste do modelo verificado pela análise dos resíduos apresentado na Tabela 8, mostra que o valor observado experimentalmente se adequou bem ao valor predito pelo modelo, indicando a qualidade do experimento realizado.



**Figura 4.** Valores observados e preditos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para obtenção de açúcares redutores, a 95 % de nível de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 9.** Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no processo de hidrólise e obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,891	0,085	1,620	2,162
1- Tempo (L)*	0,457	0,112	0,197	0,816
2- pH (L)*	-0,717	0,112	-2,152	-0,358

\* Parâmetros estatisticamente significativos

(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 10.

**Tabela 10.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão (Rg)	2,8964	2	1,4482	37,81
Resíduo (Rs)	0,1532	4	0,0383	
Falta de Ajuste (F)	0,0006	1	0,0006	0,011
Erro Puro (E)	0,1526	3	0,0508	
Total	3,0496	6		

$F_{tab} Rg/Rs = 6,94$

$F_{cal}/F_{tab} = 5,44$

$F_{tab} F/E = 10,12$

$F_{cal}/F_{tab} = 0,001$

O valor do teste F calculado para regressão - resíduo foi comparado ao valor do F tabelado a 95 % de confiança com os respectivos graus de liberdade, obtendo-se um valor de 5,44, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

O valor do teste F calculado da falta de ajuste - erro puro (95 % de confiança e com os respectivos graus de liberdade) foi comparado ao Ftabelado, resultando um valor de 0,001, indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa a obtenção de açúcares redutores a partir de hidrólise com ácido sulfúrico do farelo de mandioca (Equação 5).

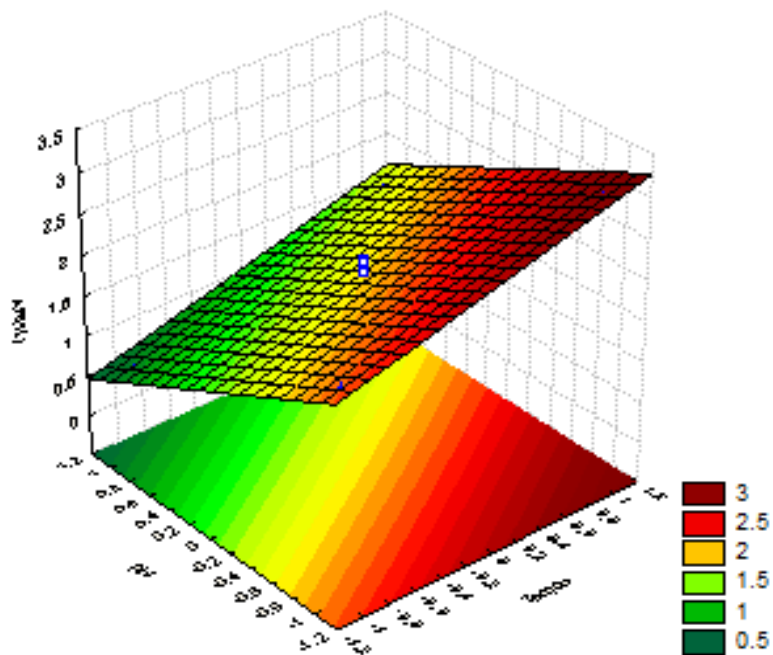
#### **Equação 5:**

$$\text{Obtenção de AR} = 1,891 + 0,457 \times \text{tempo (L)} - 0,717 \times \text{pH (L)}$$

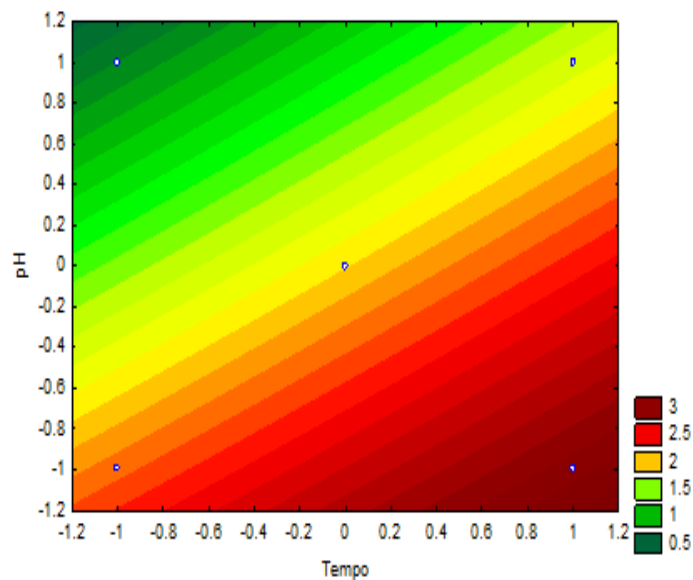
A Figura 5 mostra a superfície de resposta da variação de AR e a Figura 6, as curvas de nível da resposta contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre o rendimento de AR após a hidrólise do farelo de mandioca.

A superfície de resposta e a curva de contorno, respectivamente, Figuras 5 e 6, indicam que o aumento do tempo e a diminuição do pH implicam na maior obtenção de açúcares redutores.

A partir destas observações foi estabelecido um ponto ótimo para o processo de hidrólise ácida a partir de uma suspensão constituída por 5 % de farelo de mandioca utilizando como catalisador o ácido sulfúrico. A 121 °C, após 90 minutos de reação e em pH 0,5 obteve-se 96,48 % de rendimento de AR indicando que as condições estudadas permitiram alcançar um ponto otimizado da resposta.



**Figura 5.** Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR na hidrólise do farelo utilizando o catalisador ácido sulfúrico.



**Figura 6.** Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

#### 4.2.1.2 Glicose

A Tabela 11 refere-se aos valores de glicose obtidos após os diferentes tratamentos de hidrólise empregando como catalisador o ácido sulfúrico.

Analisando os resultados expostos na Tabela 11, observa-se que o maior valor, em porcentagem, de glicose foi 2,62 % após 90 minutos de reação a pH 0,5. A suspensão farelo e água a 5 % utilizada nos experimentos apresentou em média 3,02 % de amido (Tabela 5) e a maior concentração de glicose obtida após o processo de hidrólise corresponde a 88,24 % de rendimento. Portanto, o tratamento 2 atuou positivamente no processo de hidrólise ácida termopressurizada do farelo de mandioca na obtenção de glicose (Tabela 11).

Os resultados da Tabela 11 diferem de SAITO (2005) que obteve uma concentração de glicose de 7,3 % com um rendimento de recuperação de amido residual de 102 % após tratamento de hidrólise utilizando ácido sulfúrico 2,5 % (m/s), a 140 °C por 35 minutos. Portanto, a concentração do catalisador influencia diretamente na obtenção de glicose a partir do amido.

**Tabela 11.** Valores da concentração de glicose nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Ensaio	Tempo (min)	pH	Glicose (%) <sup>1</sup>
1	30	0,5	1,46 ± 0,053
2	90	0,5	2,62 ± 0,040
3	30	1,5	0,45 ± 0,025
4	90	1,5	1,21 ± 0,031
5	60	1,0	1,53 ± 0,040
6	60	1,0	1,63 ± 0,035
7	60	1,0	1,60 ± 0,071

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

O valor de rendimento de glicose (88,24 %) obtido no Tratamento 2 (90 minutos de reação, pH 0,5) empregando como catalisador o ácido sulfúrico não está de acordo com Hashem & Darwish (2010) que indicam que a hidrólise completa de amido ocorre através de 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> após 60 min a 100 °C. Portanto, pode concluir-se que taxa de hidrólise aumenta com o aumento da concentração do ácido, provavelmente devido ao aumento na atividade de íons de hidrogênio que participam na reação como catalisador. A mesma tendência foi observada por Tasic *et al.* (2009).

Tasic *et al.* (2009) obtiveram a mais alta taxa de dextrose equivalente (94 %) a 0,089 min<sup>-1</sup> com HCl 1M, na proporção de 1:2 (p/v), comprovando o maior poder hidrolítico do ácido clorídrico em relação ao sulfúrico.

A Tabela 12 e a Figura 6 apresentam os efeitos lineares das variáveis (tempo de reação e pH) bem como as interações dos parâmetros sobre a obtenção de glicose após o processo de hidrólise, ao nível de 95 % de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

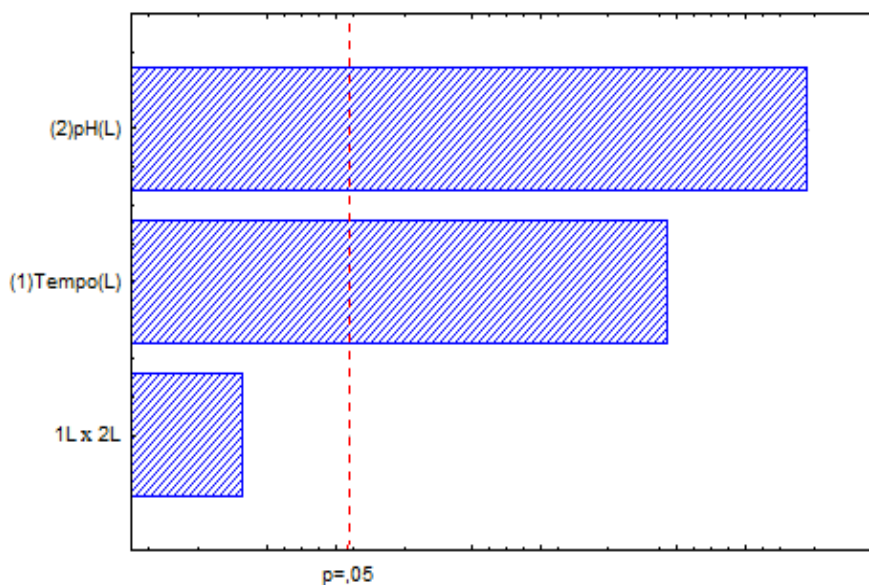
**Tabela 12.** Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Parâmetros	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,500	0,046	32,512	0,00006	1,353	1,646
1- Tempo (L)*	0,960	0,122	7,864	0,00428	0,571	1,348
2- pH (L) *	-1,210	0,122	-9,912	0,00218	-1,598	-0,821
1 x 2	-0,200	0,122	-1,638	0,19985	-0,588	0,188

\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear  
R=0,9909

O coeficiente de determinação (R) obtido foi de 0,9909, ou seja, 99,09 % da variação da resposta é explicada pelo modelo, onde apenas 0,91 % se atribuiu aos resíduos. Portanto, o modelo apresentou um excelente ajuste aos dados experimentais.

Analisando a Tabela 12 observa-se que o tempo de reação apresentou efeito positivo significativo ( $p \leq 0,05$ ) no processo de hidrólise do farelo de mandioca para obtenção de glicose. A influência de cada parâmetro pode ser observada, de uma maneira mais clara, através do gráfico de Pareto disposto na Figura 7.



**Figura 7.** Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

O pH foi o parâmetro que mais influenciou na resposta, entretanto, foi um efeito significativo negativo, indicando que a diminuição do pH (1,5 a 0,5) implicou num maior aumento na obtenção de glicose a partir do farelo de mandioca utilizando como catalisador o  $H_2SO_4$  a 50 %.

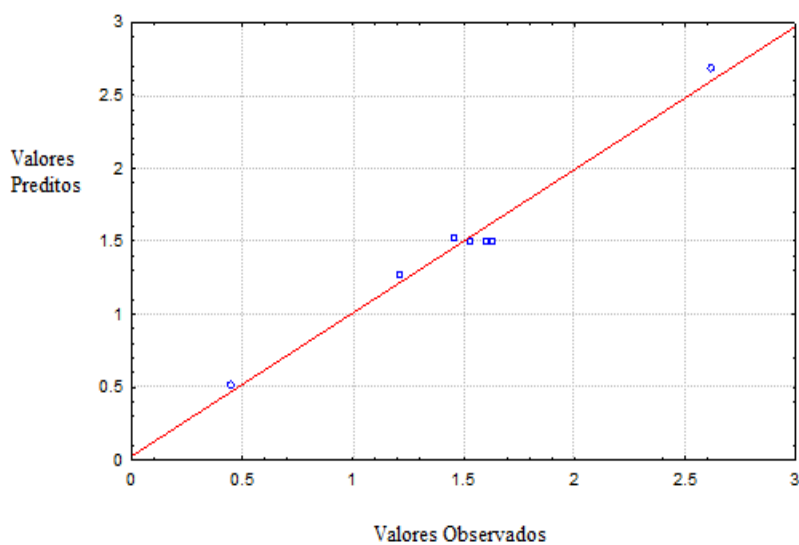
A interação entre as variáveis (tempo x pH) não foi estatisticamente significativa a 95% de confiança ( $p \geq 0,05$ ). Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior taxa de hidrólise em relação a obtenção de glicose estão relacionadas com um tempo de reação maior e um pH menor, ou seja, 90 minutos de reação a pH 0,5.

A Tabela 13 e a Figura 8 apresentam os valores observados e preditos obtidos no processo de hidrólise para obtenção de glicose.



**Tabela 13.** Valores observados, preditos e resíduos no processo de hidrólise na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Ensaio	Observado	Predito	Resíduo
1 (30 min./pH 0,5)	1,460	1,525	-0,065
2 (90 min./pH 0,5)	2,620	2,685	-0,065
3 (30 min./pH 1,5)	0,450	0,515	-0,065
4 (90 min./pH 1,5)	1,210	1,275	-0,065
5 (60 min./pH 1,0)	1,530	1,500	0,030
6 (60 min./pH 1,0)	1,630	1,500	0,130
7 (60 min./pH 1,0)	1,600	1,500	0,100



**Figura 8.** Valores observados e preditos na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

Os valores observados estão próximos aos preditos pelo modelo, indicando a qualidade do experimento realizado. O ajuste do modelo também pode ser verificado pela análise dos resíduos apresentados na Tabela 13, no qual o valor observado experimentalmente se adequou bem ao valor predito pelo modelo.

A Tabela 14 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para obtenção de glicose, a 95 % de nível de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 14.** Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no processo de hidrólise e obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

<b>Parâmetros</b>	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Coeficiente Desvio Padrão</b>	<b>Limite de Confiança (-95%)</b>	<b>Limite de Confiança (+95%)</b>
Média*	1,500	0,046	1,353	1,646
1- Tempo (L)*	0,480	0,061	0,285	0,674
2- pH (L)*	-0,605	0,0610	-0,799	-0,410

\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Teste Fcal</b>
Regressão (Rg)	2,3857	2	1,1928	56,53
Resíduo (Rs)	0,0847	4	0,0211	
Falta de Ajuste (F)	0,0400	1	0,0400	2,68
Erro Puro (E)	0,0447	3	0,0149	
Total	2,4704	6		

$F_{tab} Rg/Rs = 6,94$   
 $F_{cal}/F_{tab} = 8,14$   
 $F_{tab} F/E = 10,12$   
 $F_{cal}/F_{tab} = 0,26$

O valor do teste F calculado para regressão - resíduo foi comparado ao valor do F tabelado a 95 % de confiança com os respectivos graus de liberdade, obtendo-se um valor de 8,14, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

O valor do teste F calculado da falta de ajuste - erro puro (95 % de confiança e com os respectivos graus de liberdade) foi comparado ao Ftabelado, resultando um valor de 0,26, indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

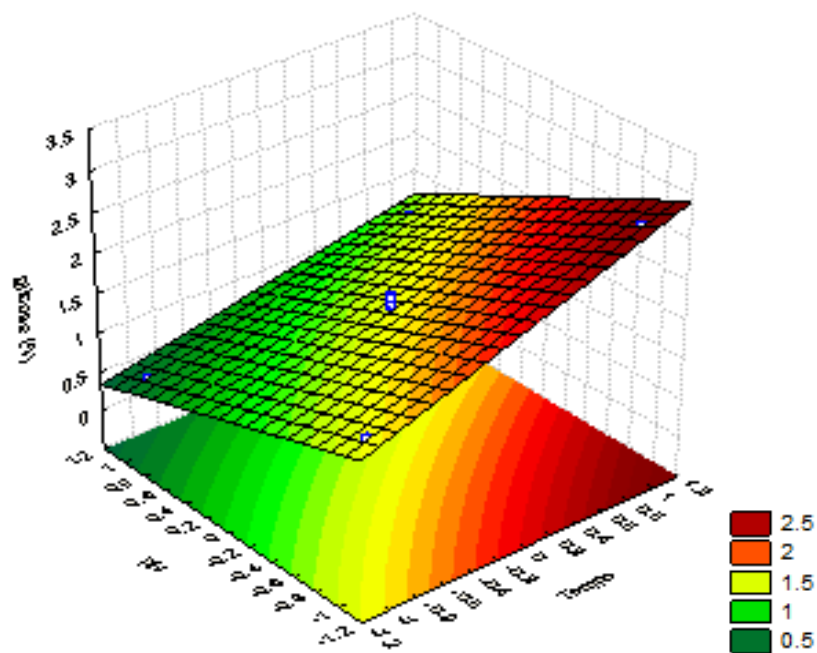
A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa a obtenção de açúcares redutores a partir de hidrólise com ácido sulfúrico do farelo de mandioca (Equação 6).

#### **Equação 6:**

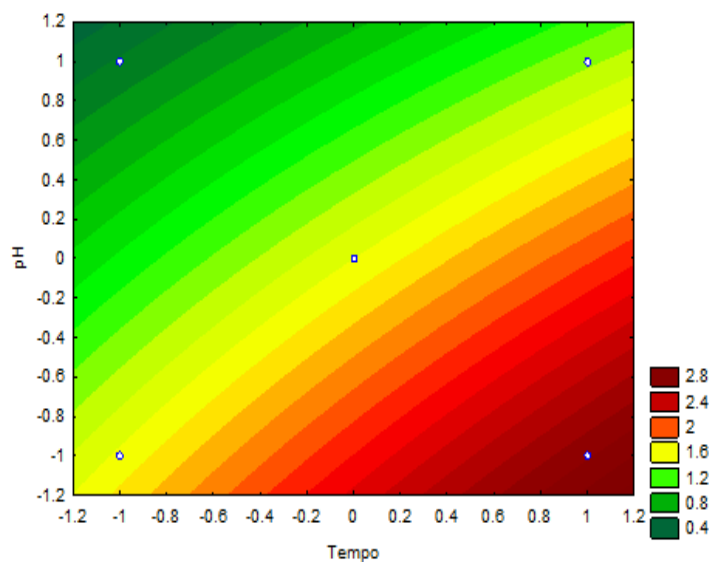
$$\text{Obtenção de AR} = 1,500 + 0,480 \times \text{tempo (L)} - 0,605 \times \text{pH (L)}$$

A superfície de resposta (Figura 9) e as curvas de contorno (Figura 10) indicam que o aumento do tempo e a diminuição do pH implicam na maior obtenção de glicose.

Na Figura 10 nota-se que ambos os fatores possuem grande influência sobre o resultado da hidrólise do amido. Nos pontos centrais, há uma queda brusca na concentração de glicose. A condição ótima se dá para os maiores valores de pH e os maiores tempo de reação.



**Figura 9.** Superfície de resposta obtida no planejamento experimental fatorial para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.



**Figura 10.** Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido sulfúrico.

## 4.2.2 Catalisador ácido fosfórico

### 4.2.2.1 Açúcares redutores

A Tabela 16 refere-se aos valores de açúcares redutores (AR) e os rendimentos (Equação 1) obtidos após os diferentes tratamentos de hidrólise empregando como catalisador o ácido fosfórico.

Na Tabela 16 observa-se que o valor máximo, em porcentagem, de AR após o processo de hidrólise foi 82,97 % e refere-se ao tratamento 2 (90 min., pH 0,5). Portanto, quanto maior tempo de tratamento e concentração de catalisador maior foi a eficiência hidrolítica.

**Tabela 16.** Valores de AR e rendimentos nos diferentes tratamentos de hidrólise utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Ensaio	Tempo (min)	pH	mL de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup> 50 %	AR <sup>1</sup> (%)	Rendimento (%)
1	30	0,5	303,33 ± 2,88	1,69 ± 0,026	55,64
2	90	0,5	303,33 ± 2,88	2,52 ± 0,020	82,97
3	30	1,5	56,66 ± 4,16	0,42 ± 0,020	13,82
4	90	1,5	56,66 ± 4,16	1,12 ± 0,020	36,87
5	60	1,0	98,66 ± 3,05	1,48 ± 0,015	48,73
6	60	1,0	98,66 ± 3,05	1,51 ± 0,017	49,72
7	60	1,0	98,66 ± 3,05	1,46 ± 0,015	48,07

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

Analisando os resultados expostos na Tabela 6, observa-se que máximo de rendimento em açúcares redutores (82,97 %) utilizando o ácido fosfórico é menor em relação aos 96,48 % de AR obtido com ácido sulfúrico (Tabela 16) e está de acordo com os resultados expressos por Gaewchingduang & Pengthemkeerati (2010).

Gaewchingduang & Pengthemkeerati (2010) observaram que os tratamentos de hidrólise a 130 °C proporcionaram, em média, 550 mg.g<sup>-1</sup> de AR empregando como catalisador o ácido sulfúrico (0,1 M) e 800 mg.g<sup>-1</sup> com o ácido fosfórico (0,1 M).

O comportamento do rendimento da taxa de hidrólise do processo apresenta dependência em relação às variáveis tempo de reação, pH de tipo de catalisador ácido empregado. Portanto, a hidrólise do amido é mais eficiente com ácido sulfúrico que com o ácido fosfórico.

A Tabela 17 e Figura 9 apresentam os efeitos lineares das variáveis (tempo de reação e pH) bem como as interações dos parâmetros sobre a obtenção de açúcares redutores após o processo de hidrólise, ao nível de 95 % de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 17.** Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Parâmetros	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,038	0,013	79,2044	0,000004	0,996	1,080
1- Tempo (L)*	0,665	0,034	19,168	0,000310	0,554	0,775
2- pH (L)*	-1,165	0,034	-33,580	0,000058	-1,275	-1,054
1 x 2	-0,045	0,034	-1,297	0,285338	-0,155	0,065

\* Parâmetros estatisticamente significativos

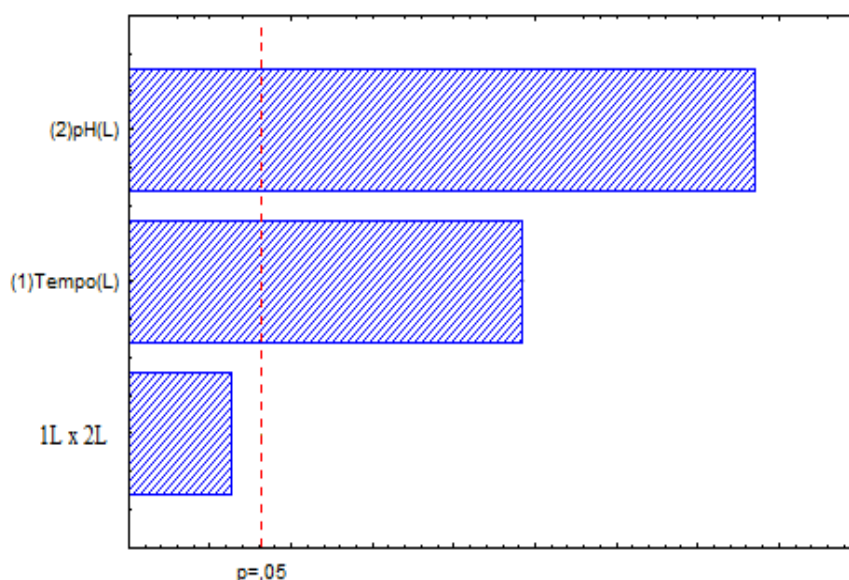
(L) Parâmetro linear

R = 0,9989

O coeficiente de determinação (R) obtido foi de 0.9989, ou seja, 99,89 % da variação da resposta é explicada pelo modelo, onde 0,11 % se atribuiu aos resíduos. Portanto, o modelo apresentou um excelente ajuste aos dados experimentais.

Analisando a Tabela 17 observa-se que o tempo de reação apresentou efeito positivo significativo ( $p \leq 0,05$ ) e o pH, efeito negativo significativo no processo de hidrólise do farelo de mandioca para obtenção de açúcares redutores. Assim, quanto maior o tempo de reação e menor o pH do meio maior será a obtenção de AR a partir do farelo de mandioca.

A influência de cada parâmetro pode ser observada, de uma maneira mais clara, através do gráfico de Pareto disposto na Figura 11.



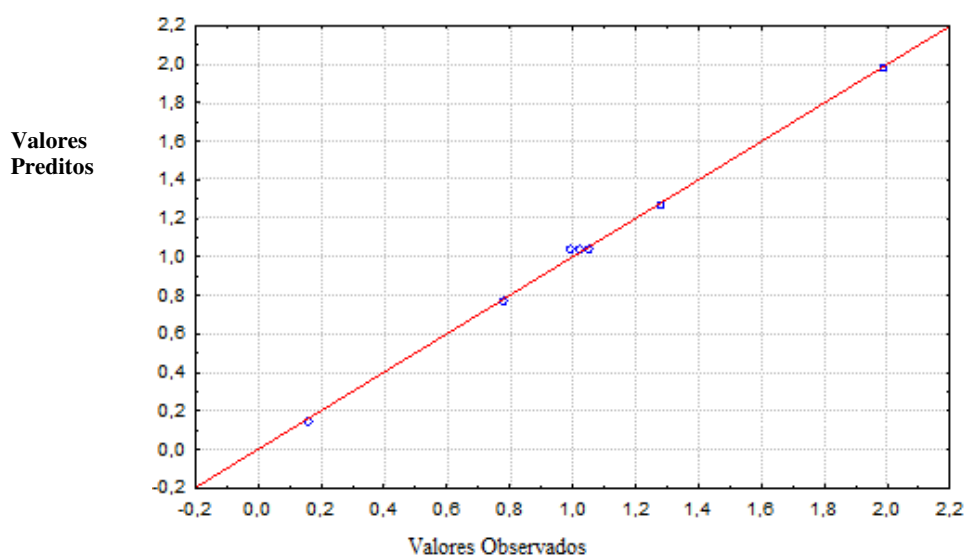
**Figura 11.** Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.

O pH foi o parâmetro que mais influenciou na resposta, entretanto, foi um efeito significativo negativo, indicando que a diminuição do pH (1,5 a 0,5) implicou num maior aumento na obtenção de AR a partir do farelo de mandioca utilizando como catalisador o  $H_3PO_4$  a 50 %. A interação entre as variáveis (tempo x pH) não foi estatisticamente significativa a 95 % de confiança ( $p \geq 0,05$ ).

A Tabela 18 e a Figura 12 apresentam os valores observados e preditos obtidos no processo de hidrólise para obtenção de AR e mostram que os valores observados estão próximos aos preditos pelo modelo, indicando a qualidade do experimento realizado.

**Tabela18.** Valores observado, predileto e residual no processo de hidrólise utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Ensaio	Observado	Predileto	Residual
1 (30 min./pH 0,5)	1,280	1,266	0,013
2 (90 min./pH 0,5)	1,990	1,976	0,013
3 (30 min./pH 1,5)	0,160	0,146	0,013
4 (90 min./pH 1,5)	0,780	0,766	0,013
5 (60 min./pH 1,0)	1,020	1,038	-0,018
6 (60 min./pH 1,0)	0,990	1,038	-0,048
7 (60 min./pH 1,0)	1,050	1,038	0,011



**Figura 12.** Valores observados e preditos na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.



A Tabela 19 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para obtenção de açúcares redutores, a 95 % de nível de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 19.** Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Coeficiente Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,038	0,013	0,996	1,080
1- Tempo (L) *	0,332	0,017	0,277	0,387
2- pH (L) *	-0,582	0,017	-0,637	-0,527

\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela ANOVA apresentada na Tabela 20.

**Tabela 20.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e tempo de reação) na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão (Rg)	1,7994	2	0,8997	642,64
Resíduo (Rs)	0,0056	4	0,0014	
Falta de Ajuste (F)	0,0020	1	0,002	1,66
Erro Puro (E)	0,0036	3	0,0012	
Total	1,8050	6		

F<sub>tab</sub> <sub>Rg/Rs</sub> = 6,94  
F<sub>cal</sub>/F<sub>tab</sub> = 92,59  
F<sub>tab</sub> <sub>F/E</sub> = 10,12  
F<sub>cal</sub>/F<sub>tab</sub> = 0,164

O valor do teste F calculado para regressão - resíduo foi comparado ao valor do F tabelado a 95 % de confiança com os respectivos graus de liberdade, obtendo-se um valor de 92,59, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

O valor do teste F calculado da falta de ajuste - erro puro (95 % de confiança e com os respectivos graus de liberdade) foi comparado ao Ftabelado, resultando um valor de 0,164, indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa a obtenção de açúcares redutores a partir de hidrólise com ácido fosfórico do farelo de mandioca (Equação 7).

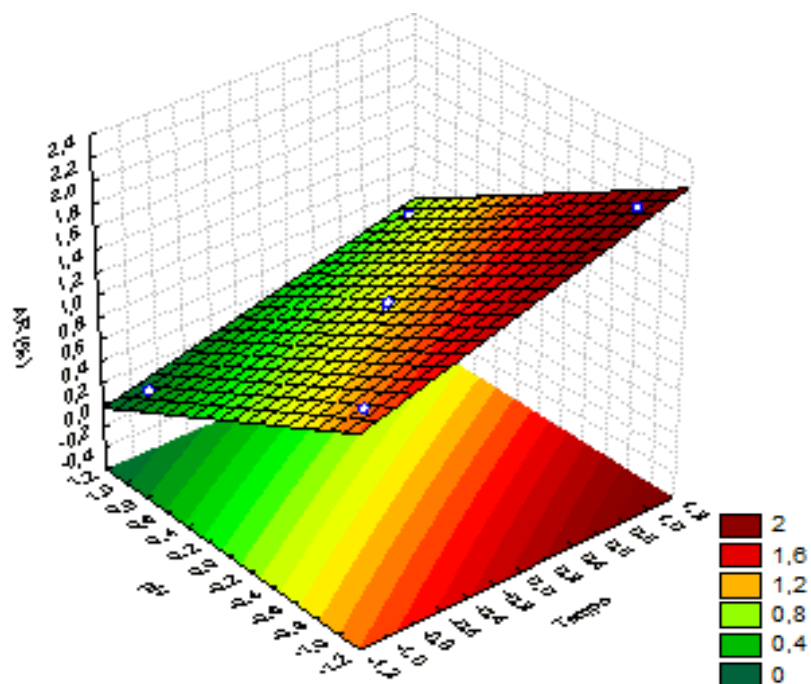
#### **Equação 7:**

$$\text{Obtenção de AR} = 1,038 + 0,332 \times \text{tempo (L)} - 0,582 \times \text{pH (L)}$$

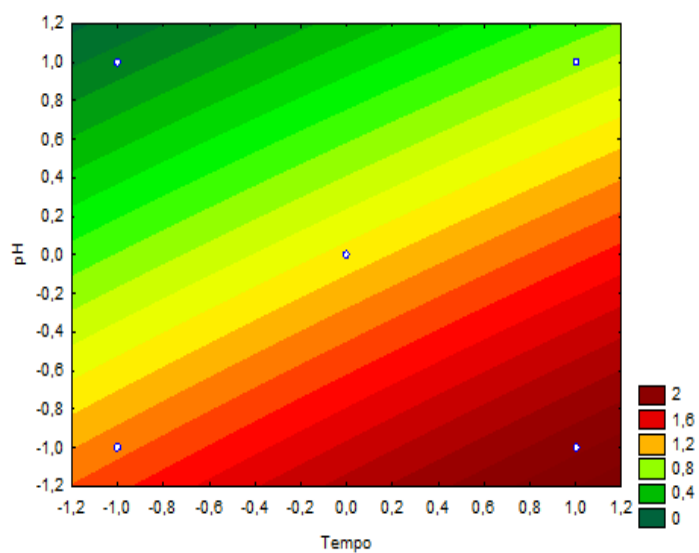
A Figura 13 mostra a superfície de resposta da variação de AR e a Figura 14, as curvas de nível da resposta contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre o rendimento de AR após a hidrólise do farelo de mandioca.

A superfície de resposta e as curvas de contorno indicam que o aumento do tempo e a diminuição do pH implicam na maior obtenção de açúcares redutores.

A partir destas observações, a 121 °C, após 90 minutos de reação e em pH 0,5 obteve-se 82,97 % de rendimento de AR não alcançando um ponto otimizado da resposta no processo de hidrólise de farelo de mandioca empregando o como catalisador o ácido fosfórico.



**Figura 13.** Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH na obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.



**Figura 14.** Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de AR utilizando o catalisador ácido fosfórico.

#### 4.2.2.2 Glicose

A Tabela 21 refere-se aos valores de glicose obtidos após os diferentes tratamentos de hidrólise empregando como catalisador o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e observa-se que no tratamento 2 (90 min., pH 0,5) obteve-se a maior porcentagem de glicose. Portanto, quanto maior tempo de tratamento e concentração de catalisador maior foi a eficiência hidrolítica.

**Tabela 21.** Valores de concentração de glicose nos diferentes tratamentos utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Ensaio	Tempo (min)	pH	GLICOSE (%) <sup>1</sup>
1	30	0,5	1,28 ± 0,0306
2	90	0,5	1,99 ± 0,0306
3	30	1,5	0,16 ± 0,0058
4	90	1,5	0,78 ± 0,0153
5	60	1,0	1,02 ± 0,0153
6	60	1,0	0,98 ± 0,0100
7	60	1,0	1,05 ± 0,0100

<sup>1</sup>Valores médios e desvio padrão, composto por três repetições.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 22, conclui-se que o pH 1,5 é fracamente glucogênico enquanto que a acidez mais drástica (pH 0,5) já é mais glucogênica.

Em comparação, o ácido fosfórico tende a proporcionar uma menor eficiência de hidrólise do farelo de mandioca que o ácido sulfúrico, sendo que, o tratamento 2 com ácido fosfórico obteve 1,99 % e com ácido sulfúrico, 2,62 % de glicose.

A Tabela 22 e Figura 15 apresentam os efeitos lineares das variáveis (tempo de reação e pH) bem como as interações dos parâmetros sobre a obtenção de glicose após o processo de hidrólise, ao nível de 95 % de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 22.** Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (tempo de reação e pH) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Parâmetros	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,038	0,013	79,204	0,000004	0,996	1,080
1- Tempo (L)*	0,665	0,034	19,168	0,000310	0,554	0,775
2- pH (L)*	-1,165	0,034	-33,580	0,000058	-1,275	-1,054
1 x 2	-0,045	0,034	-1,297	0,285338	-0,155	0,065

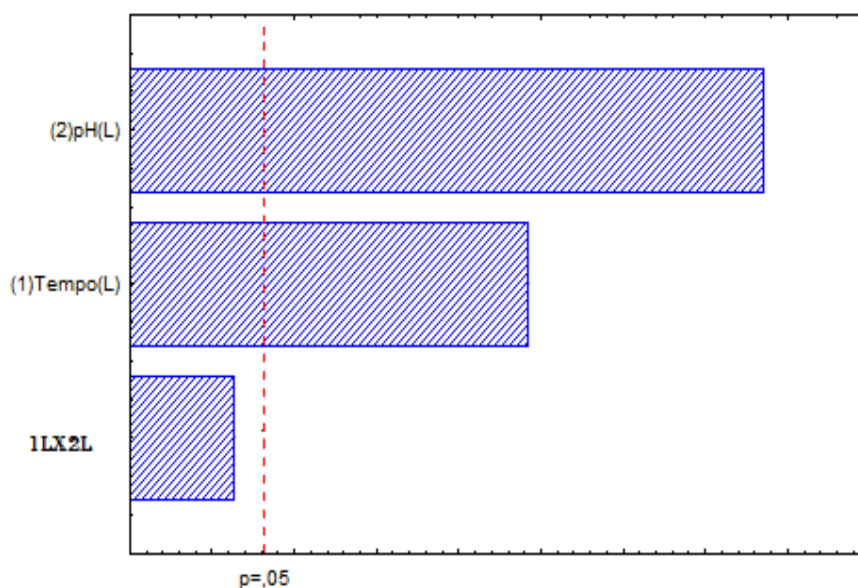
\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear  
R = 0,9989

O coeficiente de determinação (R) obtido foi de 0,999 ou seja, 99,90 % da variação da resposta é explicada pelo modelo, onde apenas 0,10 % se atribuiu aos resíduos. Portanto, o modelo apresentou um excelente ajuste aos dados experimentais.

Analisando a Tabela 22 observa-se que o tempo de reação e o pH apresentaram efeitos estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) no processo de hidrólise do farelo de mandioca para obtenção de glicose. A interação entre as variáveis (tempo x pH) não foi estatisticamente significativa a 95 % de confiança ( $p \geq 0,05$ ).

O pH foi o parâmetro que mais influenciou na resposta, entretanto, foi um efeito não significativo negativo, indicando que a diminuição do pH (1,5 a 0,5) implicou num maior aumento na obtenção de glicose a partir do farelo de mandioca utilizando como catalisador o  $H_3PO_4$  a 50 %.

A influência de cada parâmetro pode ser observada, de uma maneira mais clara, através do gráfico de Pareto disposto na Figura 12.

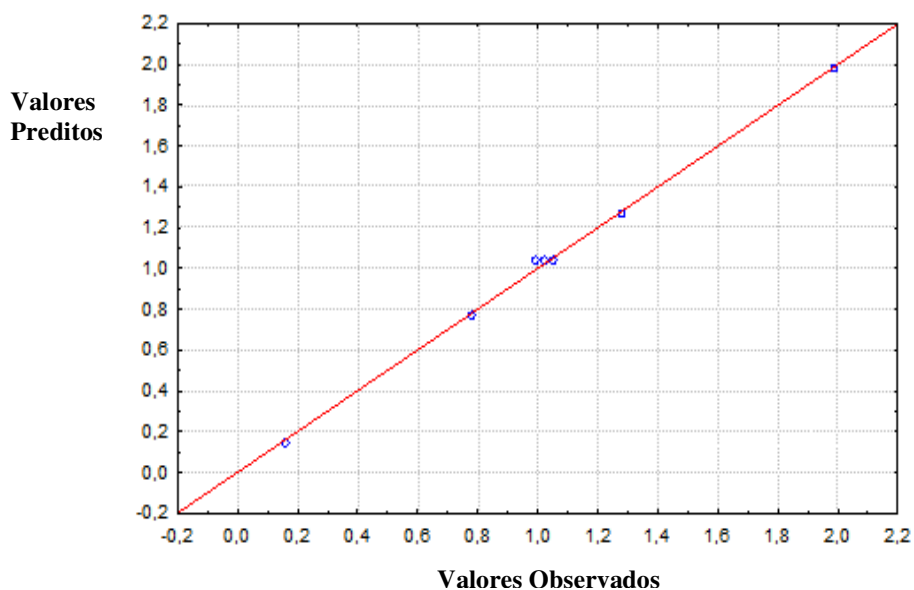


**Figura 15.** Gráfico do teste de Pareto dos efeitos lineares e interações das variáveis tempo e pH na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

A Tabela 23 e a Figura 16 apresentam os valores observados e preditos obtidos no processo de hidrólise para obtenção de glicose.

**Tabela 23.** Valores observado, predito e residual na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Ensaio	Observado	Predito	Residual
1 (30 min./pH 0,5)	1,280	1,266	0,013
2 (90 min./pH 0,5)	1,990	1,976	0,013
3 (30 min./pH 1,5)	0,160	0,146	0,013
4 (90 min./pH 1,5)	0,780	0,766	0,013
5 (60 min./pH 1,0)	1,020	1,038	-0,018
6 (60 min./pH 1,0)	0,990	1,038	-0,048
7 (60 min./pH 1,0)	1,050	1,038	0,011



**Figura 16.** Valores observados e preditos na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Os valores observados estão próximos aos preditos pelo modelo, indicando a qualidade do experimento realizado, assim, o valor observado experimentalmente se adequou bem ao valor predito pelo modelo.

A Tabela 24 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para obtenção de glicose, a 95 % de nível de confiança ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 24.** Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança processo de hidrólise e obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95 %)	Limite de Confiança (+95 %)
Média*	1,038	0,013	0,996	1,080
1- Tempo (L)*	0,332	0,017	0,277	0,387
2- pH (L)*	-0,582	0,017	-0,637	-0,527

\* Parâmetros estatisticamente significativos  
(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 25.

**Tabela 25.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH tempo de reação) na obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão (Rg)	1,7994	2	0,8997	642,64
Resíduo (Rs)	0,0056	4	0,0014	
Falta de Ajuste (F)	0,0020	1	0,0020	1,66
Erro Puro (E)	0,0036	3	0,0012	
Total	1,8050	6		

$F_{tab} \text{ }_{Rg/Rs} = 6,94$   
 $F_{cal}/F_{tab} = 92,59$   
 $F_{tab} \text{ }_{F/E} = 10,12$   
 $F_{cal}/F_{tab} = 0,164$

O valor do teste F calculado para regressão - resíduo foi comparado ao valor do F tabelado a 95% de confiança com os respectivos graus de liberdade, obtendo-se um valor de 92,59, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

O valor do teste F calculado da falta de ajuste - erro puro (95 % de confiança e com os respectivos graus de liberdade) foi comparado ao F tabelado, resultando um valor de 0,164, indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa a obtenção de glicose a partir de hidrólise com ácido fosfórico do farelo de mandioca (Equação 8).



### **Equação 8:**

$$\text{Obtenção de glicose} = 1,038 + 0,332 \times \text{tempo (L)} - 0,582 \times \text{pH (L)}$$

A Figura 17 mostra a superfície de resposta da variação de glicose e a Figura 18, as curvas de nível da resposta contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose e indicam que o aumento do tempo e a diminuição do pH implicam na maior obtenção de glicose.

#### **4.2.3 Derivados do furano**

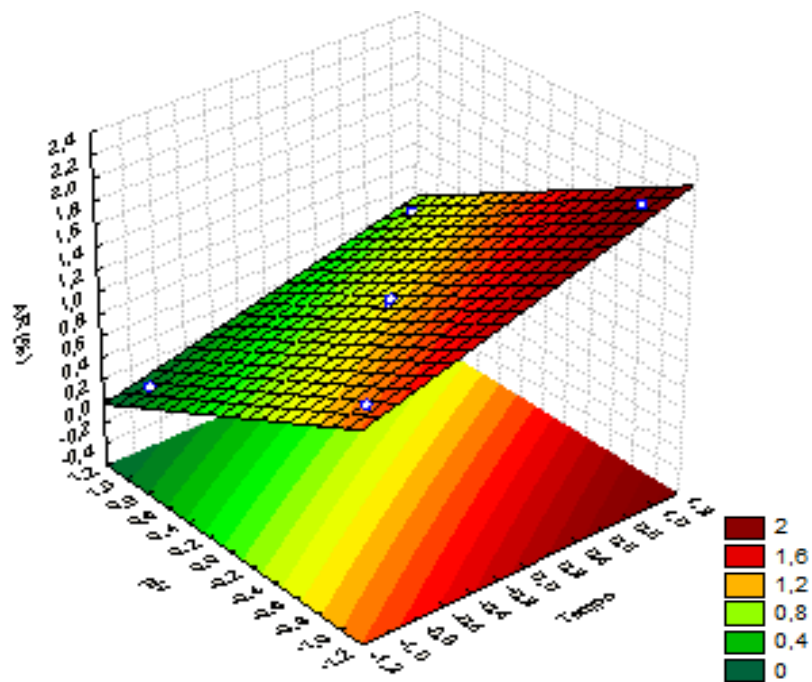
Em consequência da alta temperatura (121 °C) empregada nos tratamentos em relação ao tempo de reação e pH, os açúcares originados na hidrólise se degradam originando os compostos derivados do furano, o hidroximetilfurfural (HMF), formado da degradação das hexoses.

O material hidrolisado foi quantificado quanto a concentração de hidroximetilfurfural (HMF) e observou-se que o tratamento termopressurizado com ácido sulfúrico gerou 0,17 g/L de HMF no tratamento 2 (90 min., pH 0,5) e 0,02 g/L de HMF no tratamento 4 (90 min, pH 1,5). Já os tratamentos utilizando o catalisador ácido fosfórico não geraram concentrações detectáveis de HMF.

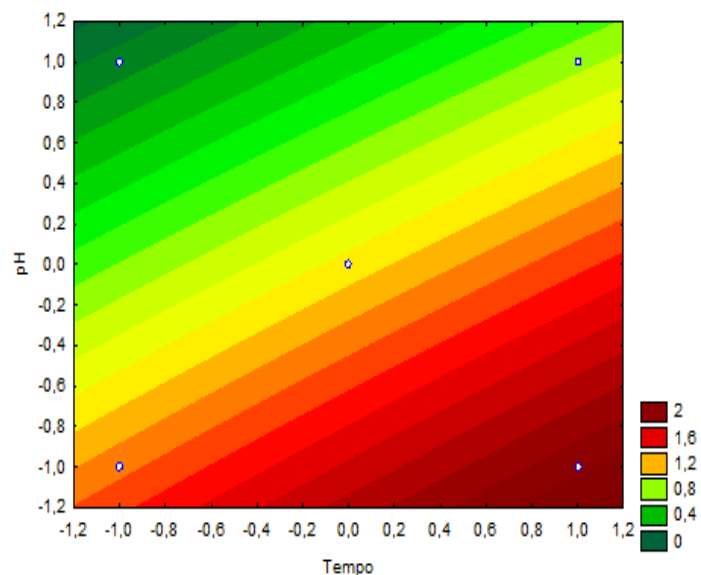
O ácido fosfórico produz teores menos elevados de co-produtos de degradação de açúcares e é menos glucogênica que o ácido sulfúrico. Estudos anteriores observaram que o rendimento de glicose diminuiu com a alta concentração de ácido devido à degradação dos monômeros. No entanto, não foi observado neste estudo.

A análise do farelo resultou em baixa concentração de HMF (0,17 g /L) e os teores desses compostos presentes no hidrolisado encontram-se abaixo dos níveis (4,0 g/L) capazes de inibir o metabolismo da levedura (TAHERZADEH, 1999).

Jeong *et al.* (2010) obtiveram 0,04 g / L de HMF no hidrolisado após o processo de hidrólise da palha de colza nas seguintes condições: concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,76% e temperatura de 152,6 °C com um tempo de reação de 21 min.



**Figura 17.** Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.



**Figura 18.** Curvas de contorno obtida no planejamento experimental para avaliar os efeitos do tempo de reação e pH sobre a obtenção de glicose utilizando o catalisador ácido fosfórico.

#### 4.2.4 Massa residual de farelo

O farelo utilizado no trabalho apresentou uma umidade de 13,74%, portanto, a suspensão 5 % (p/v) apresenta 4,31 g de farelo seco. O material hidrolisado foi quantificado quanto à massa residual de farelo (Tabela 26).

**Tabela 26.** Massa de farelo residual após os tratamentos de hidrólise ácida termopressurizada.

Ensaio	Tempo (min)	pH	Farelo residual (%)	
			H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
1	30	0,5	1,24 ± 0,34	1,44 ± 0,36
2	90	0,5	1,07 ± 0,02	1,22 ± 0,36
3	30	1,5	1,81 ± 0,03	2,75 ± 0,35
4	90	1,5	1,34 ± 0,05	1,48 ± 0,31
5	60	1,0	1,17 ± 0,35	1,25 ± 0,31
6	60	1,0	1,17 ± 0,35	1,25 ± 0,31
7	60	1,0	1,17 ± 0,35	1,25 ± 0,31

A Tabela 26 mostra que as amostras obtidas dos tratamentos em pH 0,5 apresentaram menor quantidade de farelo residual em relação as amostras provenientes dos tratamentos em pH 1,0 e 1,5.

As amostras obtidas do tratamento 2 (90 min., pH 0,5) apresentaram menor quantidade de farelo residual e mesmo sendo uma pequena porcentagem, o farelo residual ainda pode ser submetido a uma segunda hidrólise para a verificação de um possível melhor rendimento total do processo.

#### 4.2.5 Ensaio fermentativos

O material hidrolisado foi filtrado, neutralizado e concentrado para compor o meio de fermentação. Esta foi conduzida pelo processo de batelada alimentada (fed-batch) em triplicata, utilizando a linhagem M-26 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

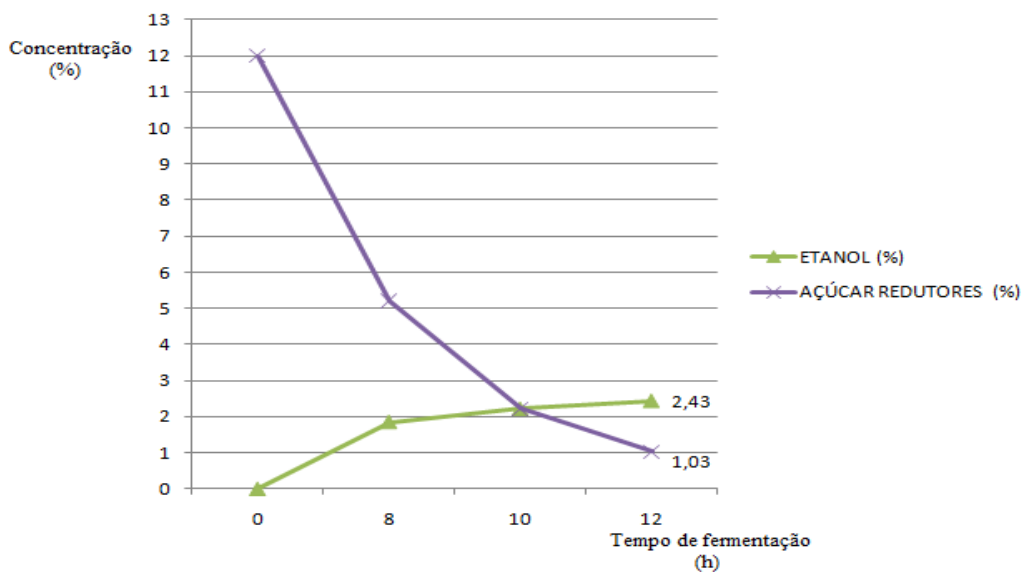
Após a realização e análise das hidrólises, com base no teor de AR produzido foi utilizado o hidrolisado proveniente do tratamento que empregou o ácido sulfúrico (pH 1,0) por apresentar um menor custo em relação ao ácido fosfórico. Os ensaios fermentativos não foram realizados a partir do hidrolisado em pH 0,5 pois este pode interferir no rendimento final do processo, uma vez que aumenta a quantidade de sal formado, podendo influenciar negativamente o processo de fermentação.

A Tabela 27 e as Figuras 19 e 20 referem-se à produção etanol pela linhagem *S. cerevisiae*, o consumo de AR e as alterações (acidez e pH) que ocorreram no meio fermentativo após 12 horas de fermentação.

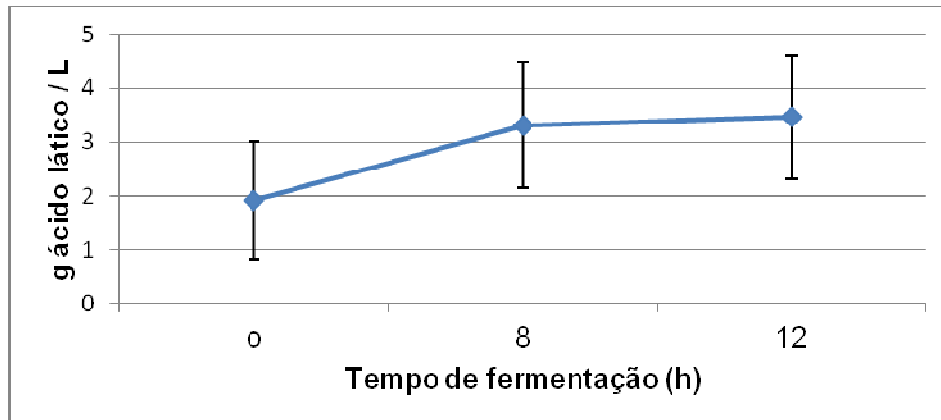
**Tabela 27.** Valores de tempo de fermentação, concentração de açúcares redutores (AR), pH, acidez do vinho e concentração de etanol.

<b>Tempo de Fermentação (h)</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Açúcares Redutores (%)</b>	9,4	5,2	2,21	1,03
<b>pH</b>	4,15	4,2	4,21	4,21
<b>Acidez do Vinho (g/L)</b>	2,54	4	4,13	4,13
<b>Etanol (g/L)</b>	0	1,85	2,21	2,43

Inicialmente o mosto continha 12 % de Brix e 9,4 % de AR e após a fermentação obteve-se uma porcentagem de açúcar redutor residual total (ARRT) de 1,03 % (p/v) na amostra final de fermentação, o que mostra que grande parte do açúcar oferecido inicialmente foi consumido pela levedura.



**Figura 19.** Concentração de açúcares redutores (AR) e de etanol após 12 horas de fermentação.



**Figura 20.** Acidez total do material fermentado no tempo inicial (0), após 8 e 12 horas de fermentação.

O rendimento em etanol alcançado foi de 50,59 % (Equação 2) e produtividade foi de 0,9 g/L.h (Equação 3) após 12 horas de fermentação. Este valor é tido como bom, já que, de acordo com Reguly (1996), o máximo teórico dificilmente é alcançado (51,11 %). O

rendimento obtido neste trabalho está próximo ao estudo de Curvelo-Santana *et al.* (2010) que obteve 45 %.

Segundo Bringhenti *et al.* (2007) num processo de fermentação, admite-se que rendimentos entre 43 e 49 % sejam considerados adequados e indicativos de um bom processo de fermentação. Portanto, a de produção de etanol a partir de farelo de mandioca com hidrólise ácido mostrou-se eficiente.

O rendimento alcoólico (50,59 %) foi superior aos 39 % de etanol obtido por Ferreira *et al.* (2006), que utilizaram 10 % de amido de mandioca hidrolisados por amilases de malte de milho a pH 5,0 e 65 °C.

Segundo Srikanta *et al.* (1987) o rendimento do processo de produção de etanol a partir de farelo de mandioca com hidrólise ácido-enzima apresentou eficiência da ordem de 65,52 %, enquanto o presente trabalho empregando somente a hidrólise ácida do farelo de mandioca foi 50,59 %.

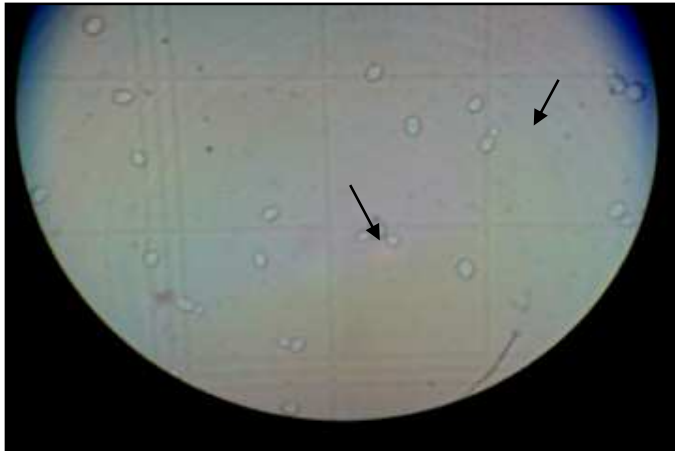
Srinorakutara *et al.* (2006), constatou-se que a produção de etanol máximo obtido em 24 horas de fermentação foi de 3,62 % (p/v), correspondendo a 91 % do rendimento teórico.

Oliva-Neto e Yokoya (1994) verificaram que concentrações de ácido láctico acima de 4 - 5 g/L diminuem significativamente o rendimento alcoólico devido a inibição do metabolismo e viabilidade da levedura. Assim, a quantidade de ácido produzido influenciou de forma negativa no processo fermentativo.

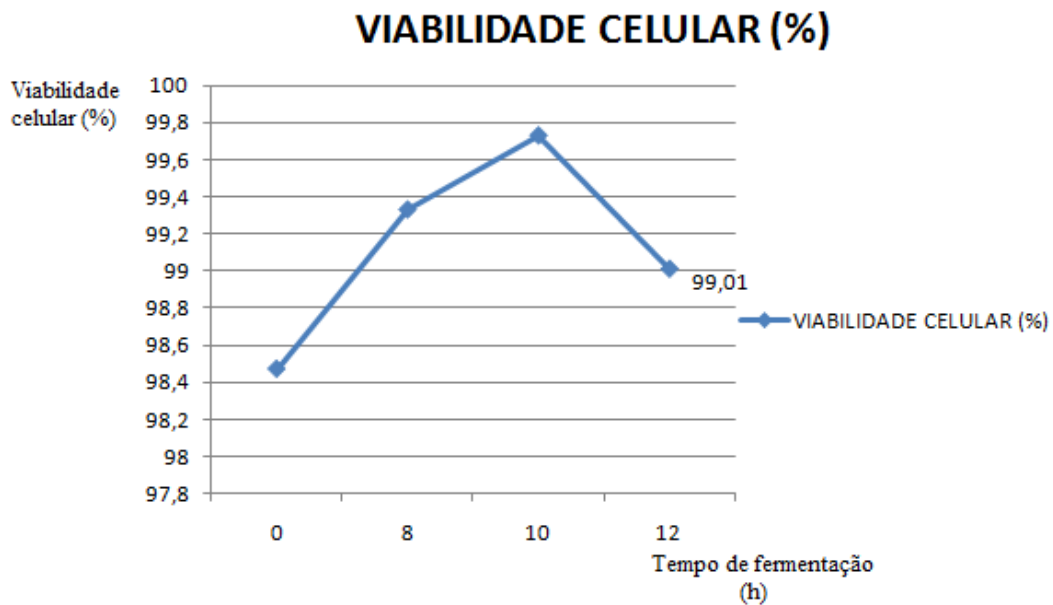
Segundo Maiorella *et al.* (1983), o ácido láctico possui uma hidroxila extra, caracterizando-se assim, por uma menor solubilidade aos lipídeos em relação aos ácidos acético, fórmico e láctico e sua propriedade inibitória das funções de manutenção das células ocorre em concentrações mais elevadas, na faixa de 10 - 40 g/L.

De acordo com Ngang *et al.* (1989), a pressão osmótica do meio e a quantidade do inóculo exercem influência no grau de toxicidade do ácido láctico, sendo inversamente proporcionais.

A Figura 21 mostra as células de *S. cerevisiae* M-26 após 12 horas de fermentação e a Figura 22 refere-se a viabilidade celular durante o processo fermentativo.



**Figura 21.** Células da linhagem *S. cerevisiae* M-26 após 12 horas de fermentação, com destaque para a formação de brotos.



**Figura 22.** Viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* M-26 após 12 horas de fermentação.

O resultado obtido mostra a presença de brotos que indica a presença do processo de renovação celular das leveduras e verifica-se uma pequena queda na viabilidade celular após 12 horas de fermentação.

Segundo Carvalho (2001) a taxa de brotamento não apresenta tendência definida e não guarda necessariamente relação com o crescimento do fermento e nem com a viabilidade, pois esta é uma medida pontual e pode sofrer a crítica de que o broto demora mais ou não se desprende da célula mãe se a condição nutricional assim induzir.

## 5. CONCLUSÃO

A mandioca tem um grande potencial de utilização para produção de etanol por suas características biológicas que podem colaborar substancialmente para diminuir os impactos sociais e ambientais decorrentes da produção desta *comodity*.

A utilização do farelo de mandioca para a fabricação de bioetanol se dariaprincipalmente para a melhoria na distribuição de renda em regiões de baixa densidade populacional, podendo contribuir para o desenvolvimento da cultura em regiões de solos de baixa produtividade.

A hidrólise é tanto mais rápida quando maior o poder ionizante do ácido e o emprego do ácido sulfúrico como catalisador no tratamento 2 (90 minutos de reação e pH 0,5), a 120 °C obteve maior concentração de açúcares redutores (2,93 %) e de glicose (2,62 %) e um rendimento de 96,48 % de açúcares redutores,.

O rendimento da fermentação alcoólica foi de 50,59 %. Sendo assim, o emprego do hidrolisado de amido de mandioca na produção de álcool mostrou-se viável e ele pode ser fermentado.



## **Sugestões para Trabalhos Futuros**

Diante dos resultados apresentados e conclusões sugere-se:

Trabalhar com hidrólise de biomassas de interesse nacional, como resíduos das agroindústrias de palha de arroz, de suco de laranja, engaço do cacho de bananas, entre outros, com alto teor de matéria amilácea-celulósica, para a obtenção de açúcares fermentecível.

Aumentar o tempo de reação da hidrólise que empregou o catalisador ácido fosfórico com o objetivo de otimizar o rendimento.

Fazer testes de hidrólise com sistema contínuo (retirada dos produtos de reação tão logo fossem formados), minimizando assim a degradação dos açúcares formados.

Usar um sistema de aquecimento rápido do reator, assim como de um resfriamento rápido dos produtos de reação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. *Produção de álcool da mandioca*. Ano II, n. 10, Abril - Junho/2005.

ABAM Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. *Álcool de mandioca atrai investimentos*. Ano IV, n. 13, Janeiro - Março/2006.

ABUD, C.L. *Avaliação de uma população de células de Saccharomyces cerevisiae submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas*. Araraquara: Instituto de Química, UNESP, 1997. Dissertação (Mestrado).

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *J. of Food Eng.*, Oxford, v. 55, p. 309-318, 2002.

AGU, R.C.; AMADIFE, A.E.; UDE, C.M.; ONYIA, A.; OGU, E.O.; OKAFOR, M.; EZEJIOFOR, E. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. *Perg.Waste Manag.*, v. 17, n. 1, p. 91-96, 1997.

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB Açúc. e Alc.*, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.

ALVES, L.R.A. *O mercado brasileiro e mundial de álcool e perspectivas para o álcool de mandioca*. In.: IV Workshop sobre tecnologias em agroindústrias de tuberosas tropicais: mandioca. Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Cerat) Universidade Estadual Paulista (Unesp). Botucatu, p. 22-29, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Official methods of analysis*. 14<sup>a</sup> ed., Washington, D.C., 1984

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16<sup>a</sup> ed., Arlington, v. 1, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16<sup>a</sup> ed., Washington, v. 2, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev., 2010.

AN, J.; BAGNELL, L.; CABLESKI, T.; STRAUSS, C.R.; TRAINOR, R.W. Applications of High- Temperature Aqueous media for Synthetic Organic Reactions. *J. of Org. Chem.*, v. 62, p. 2505-2511, 1997.

BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D.; SLÁVIKOVÁ, I; PÁTKOVÁ, J; DÖMÉNY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v. 21, p. 337-341, 1999.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Proc. Biochemistry*, Oxford, v. 38, p. 187-192, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Campinas: Edunicamp. 2001. p. 406.

BERTOLINI, A.C.; CEREDA, M.P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 18, n. 2, 1998.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, 21 out., p. 3-25, 1978.

BEMILLER, J.N. Acid Hydrolysis and Other Lytic Reactions of Starch in WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. *Starch: Chem. and Tech.*, v. 1, Academic Press, London., New York, p. 153-182, 1984.

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

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

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 2ª ed., São Paulo: Editora Varela Ltda, p.11-70, 1989.

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

BOBLETER, O. Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants. *Prog. Polym. Sci.*, v. 19, p. 797-841, 1994.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álc. e Açúc.*, v.3, n.9, p.10-13, 1982.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Alcoholic fermentation of starchy hidrolisated substrate with sugar cane residue. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

CABELLO, C. *Matérias-primas amiláceas para fins energéticos*. V Workshop sobre tecnologias em agroindústrias de tuberosas tropicais. Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Cerat). Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.

CARVALHO, R.S. *Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica*. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2001. 74 p. Dissertação (Mestrado).

CARVALHO, W.; BATISTA, M.A.; CANILHA, L.; SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. *J. of Chem. Tech. and Biotech.*, v. 79, p. 1308-1312, 2004.

CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil*. São Paulo: Paulicéia, 1994. 174 p.

CEREDA, M.P. *Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca*. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, 1996. 56 p.

CEREDA, M.P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In. *Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, cap.1, p.13-37, 2001.

CEREDA, M.P. Propriedades gerais do amido. In. *Propriedades gerais do amido*. São Paulo: Fundação Cargill, v.1, cap.2, p. 21-56, 2002.

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL – CTBE. *Bioetanol*. Disponível em: <http://www.ctbe.org.br>. Acesso em: 07 de junho de 2010.

COOCK, J.H. *Cassava: New potential for a neglected crop*. Westview Press, Boulder, CO, 1985. 90 p.

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Bioch.*, Oxford, v. 37, p. 937-941, 2002.

CURVELO-SANTANA, J.C.; EHRHARDT, D.D., TAMBOURGI, E.B. Otimização da produção de álcool de mandioca. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 613-617, 2010. ISSN 0101-2061

CUZENS, J.C.; MILLER, J.R. Acid Hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renew.Energy*, Schenectady, v. 10, p. 285-290, 1997.

CYSEWSKI, G.R.; WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnol. and Bioeng.* v. 20, p. 1421-1430, 1978.

DAIUTO, E.R.; CEREDA, M.P. CARVALHO L.J.C.B. Características e Propriedades do Amido Extraído de Camadas do Tecido da Raiz de Mandioca cv. Mico (*Manihot esculenta* Crantz). *Braz. J. Food Technol.*, v. 5, p. 217-223, 2002.

DEMIRGAS, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conver. and Manag.*, v. 42, p. 1357-1378, 2001.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 177-182, 2006.

FADEL, A.D. Álcool de mandioca? Por quê?. *ABAM - Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca*. Ano IV, nº14, Abril - Junho/2006.

FAO - *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*, 2007. Disponível em: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=408&lang=es> acesso em 15 de junho de 2007.

FERREIRA, G.B.; MELO, V.V.; LOPES, F.L.G.; SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOUGI, E.B. Produção de álcool a partir da hidrólise do amido de mandioca por amilases do malte de milho. *Rev. Sodebras*, 2006.

FONTANA, J.D.; PASSOS, M., BARON, M.; MENDES, S.V.; RAMOS, L.P. Cassava starch maltodextrinization / monomerization through thermopressurized aqueous phosphoric acid. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 91-93, p. 469-478, 2001.

FONTANA, J.D.; MITCHELL, D.A.; MOLINA, O.E.; GAITAN, A.; BONFIM, T.M.B.; ADELMANN, J.; GRZYBOWSKI, A.; PASSOS, M. Starch depolymerization with diluted phosphoric acid and application of the hydrolysate in astaxanthin fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 3, p. 305-310, 2008.

FUKUSHIMA, S.R.; HATFIELD, R.D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 4, p. 505-511, 2003.

GAEWCHINGDUANG, S.; PENGTHEMKEERATI, P. Enhancing efficiency for reducing sugar from cassava bagasse by pretreatment. *World Academy of Scien., Eng. and Tech.*, v. 70, 2010.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Kinetic Modelling of Corncob Autohydrolysis. *Process Bioch.*, v. 36, p. 571-578, 2001.

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2<sup>a</sup> ed., New York, W.H. Freeman and Company, 1995. 640 p. ISBN 0-71-67 2608-4.

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

HASHEM, M.; DARWISH, S.M.I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioen.*, v. 34, p. 953-959, 2010.

INGLEDEW, W.M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: how does the technology affect yeast. 2003. In: BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus* contaminated continuous, and batch fermentations. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 21, p. 83-88, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. 317 p.

JALEEL, S.A.; SRIKANTA, S.; GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K. Simultaneous solid phase fermentation and saccharification of cassava fibrous residue for production of ethanol. *Starch Stärke*, v. 40, n. 2, p. 52-8, 1988.

JEONG, T.S.; UM, B.H.; KIM, J.S.; OH, K.K. Optimizing dilute-acid pretreatment of rapeseed straw for extraction of hemicelluloses. *Applied Bioch. and Biotech.* v. 161, p. 22-33, 2010.

KIM, S.B.; YUM, D.M.; PARK, S.C. Step-change Variation of Acid Concentration in a Percolation Reactor for Hydrolysis of Hardwood Hemicellulose. *Bioresource Tech.*, v. 72, p. 289-294, 2000.

KUÇUK, M.M.; DEMIRBAS, A. Biomass Conversion Process. *Energy Convers. Mgmt.*, v. 38, p. 151-165, 1997.

KUNHI, A.A.M.; GHIDYAL, N.P.; LONSANE, B.K.; AHMED, N.P.; NATARAJAN, C.P. Studies on production of alcohol from saccharified waste residue from cassava starch processing industries. *Starch Stärke.*, v. 33, n. 8, p. 275- 9, 1981.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G. NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enz. and Microbial Tech.*, v. 24, p. 151-159, 1999.

LASER, M. A comparison of liquid hot and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Tech.*, Amsterdam, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEBOURG, C. *Brasamide et la féculé: une histoire d'amour*. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais (Cerat), Universidade Estadual Paulista, 1996. 59 p.

LEONEL, M. *Uso de enzimas complementares na produção de etanol a partir de farelo de mandioca*. Botucatu, 1998. 116 p. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) -

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Sacarificação do resíduo fibroso de fecularias. I: seleção da concentração do resíduo. In: Jornada científica da associação dos docentes. 1995. Botucatu. *Anais*. Botucatu: Associação dos Docentes, Universidade Estadual Paulista, 1995. p. 203.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Uma nova proposta de uso para o farelo de mandioca. *Bol. França - Flash Meio Amb.Agric.*, n. 13, p. 1-2, 1997.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Starch extraction from cassava fibrous residue. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 20, n. 1, 2000.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 19, n. 2, 1999.



MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. and Bioeng.*, v.23, n.1, p.103-121, 1983.

MALACRINÒ, P.; TOSI, E.; GARAMIA, G.; PRISCO, R.; ZAPPAROLI, G. The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high stress. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 40, p. 466-472, 2005.

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

MOCHIDZUKI, K.; SAKODA, A; SUZUKI, M. Liquid-phase thermogravimetric measurement of reaction kinetics of the conversion of biomass wastes in pressurized hot water: a kinetic study. *Adv. in Environ. Research*, v. 7, p. 421-428, 2003.

MOK, W.S.L.; ANTAL, M.J.JR. Uncatalyzed Solvolysis of Whole Biomass Hemicellulose by Hot Compressed Liquid Water. *Ind. Eng. Chem. Res.* v. 31, p. 1157-1161, 1992.

MORESCHI, S.R.M. *Hidrólise, com água subcrítica e CO<sub>2</sub>, do amido e celulose presentes no resíduo de extração supercrítica de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*): produção de oligossacarídeos*. Campinas, 2004. 183 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA), Universidade Estadual de Campinas. Tese (Doutorado).

MOTTA, L.C. *Utilização de resíduos de industrialização de farinha de mandioca em digestão anaeróbia*. 1985. 119 p. Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista de Botucatu. Dissertação (Mestrado).

NELSON, N.A. Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biolog. Chem.*, v. 153, p. 375-380, 1944.

NELSON, D.A.; THEANDER O. Aqueous, high-temperature transformation of carbohydrate relative to utilization of biomass, *Adv. Carbohyd. Chem. Bi.*, v. 46, 1988.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microb. Biotechnol.*, v.31, p. 125-128, 1989

OLIVA-NETO, P. *Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras*. Campinas, 1995. 183 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Tese (Doutorado).

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 10, p. 697-699, 1994.

OOMORI, T.; KHAJAVI, S.H.; KIMURA, Y.; ADACHI, S.; MATSUNO, R. Hydrolysis of Disaccharides containing Glucose Residue in Subcritical Water. *Bioch. Eng. J.*; v. 18, p. 143-147, 2004.

OVEREND, R.P., CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 321, p. 523-536, 1987.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Tech.*, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PEREIRA JR, N. Biotecnologia de Hemicelulose. In: Enzitec – IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. 1999. Rio de Janeiro. *Anais. Enzitec - IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, v. 1, p. 1-5, 1999.

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

REGULY, J.C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. ed. Universitária - UFPel, 1996. 330 p.

RAUPP, D.S. MOREIRA, S.S.; BANZATTO, D.A.; SGARBIERI, V.C. Composição e propriedades fisiológico - nutritivas de uma farinha rica em fibra insolúvel obtida do resíduo fibroso de feccularia de mandioca. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 19, n. 2, 1999.

RAUPP, D.S.; SGARBIERI, V.C. Efeitos de frações fibrosas extraídas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) na utilização de macro e micronutrientes da dieta pelo rato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas, v. 16, n. 2, p. 100-107, 1996.

RIVERA, C.J., GERARDI, A.G., INFANTE, R.B., CARRASCO, H.J., RODRIGUES, O. Dietary fiber analysis of cassava using gravimetric methods. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 43, n. 1, p. 78-80, 1993.

RUBIO, M.; QUESADA, J.; GÓMEZ, D. Ozonation products of organosolvolytic extracts from vegetal materials. *J. of Agric.l and Food Chem.*, Washington, v. 46, n. 2, p. 692-697, 1998.

SAITO, I.M. *Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico*. 2005. 97 p. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura).

SARMENTO, S.B.S. *Caracterização da fécula de mandioca (Marinhot esculenta C.) no período de colheita de cultivares de uso industrial*. 1997. 126 p. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese (Doutorado).

SASAKI, M.; KABYEMELA, B.; MALALUAN, R.; HIROSE, S.; TAKEDA, N.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water. *J. Supercrit. Fluids*, v. 13, p. 261-268, 1998.

SAVAGE, P.E.; GOPALAN, S.; MIZAN, T.I.; MARTINO, C.J.; BROCK, E.E. Reactions at Supercritical Conditions: Applications and Fundamentals. *AIChE J.*, v. 41, p. 1723-1778, 1995.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONCALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 2, 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)*. Imprensa Universitária da UFV. Viçosa, 3ª ed., 2002, 235 p.

SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biom. and Bioener.*, Oxford, v. 24, p. 475-486, 2003.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, n.160, p. 69-73, 1945.

SRIKANTA, S.; JALEEL, S.A.; GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K.; KARANTH, N.G. Novel Technique for saccharification of cassava fibrous waste for alcohol production. *Starch Stärke*, v. 39, n. 7, p. 234-37, 1987.

SRINORAKUTARA, T.; KAEWVIMOL, L.; SAENGOW, L. Approach of Cassava Waste Pretreatments for Fuel Ethanol Production in Thailand. *J. Sci Res. Chula*. 2006.

SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Biores. Tech.*, Amsterdam, v.71, p. 63-69, 2000.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Tech.*, Oxford, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAHERZADEH, M.J. *Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies*. Department of Chemical Reaction Engineering Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, 1999.

TASIC, M.B.; KONSTANTINOVIC, B.V.; LAZIC, M.L.; VELJKOVIC, V.B. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochem. Eng. J.*, v. 43, p. 208-11, 2009.

VALLE, T.L. *Mandioca para a produção de etanol*. ABAM - Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. Disponível em: <[http://www.abam.com.br/mat\\_tecnicos/mandioca.pdf](http://www.abam.com.br/mat_tecnicos/mandioca.pdf)> Acesso 13 de junho de 2010.

VIANA, A.E.S.; SEDIYAMA, T.; CECON, P.R.; LOPES, S.C.; SEDIYAMA, M.A.N. Estimativas de tamanho de parcela em experimentos com mandioca. *Horticultura Brasileira*, v. 20, p. 58-63, 2002.

VILELA, E.R.; FERREIRA, M.E. Tecnologia de produção e utilização do amido de mandioca. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 69-74, 1987.

WALTER, A.; ROSILLO-CALLE, F.; DOLZAN, P.; PIACENTE, E.; CUNHA, K. B. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biom. and Bioener.*, v.32, p. 730-748, 2008.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E.F. *Starch: Chemistry and Technology*. 2<sup>a</sup> ed. London: Academic Press, p. 183-247, 1984.

WOICIECHOWSKI, A.L.; NITSCHKE, S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. *Braz. arch. biol. technol.*, Curitiba, v. 45, n. 3, 2002.

WOSIACHI, G.; CEREDA, M.P. Characterization of pinhão starch. Part I: extraction and properties of starch granules. *Starch/Stärke*, v. 37, n. 7, p. 224-227, 1985.

YAN, Y.; LI, T.; REN, Z. R.; LI, G. A Study on catalytic hydrolysis of peat. *Biores. Tech.*, v. 57, p. 269-273, 1996.