



**Universidade Estadual do Centro-Oeste**

**SIMONE CRISTINA LOURES PEREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ÁLCOOL UTILIZANDO A *Cyperus  
esculentus* VIA ROTA ENZIMÁTICA E ÁCIDA**

**GUARAPUAVA-PR**

**2014**

**SIMONE CRISTINA LOURES PEREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ÁLCOOL UTILIZANDO A *Cyperus  
esculentus* VIA ROTA ENZIMÁTICA E ÁCIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues

GUARAPUAVA-PR

2014

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

P436e Pereira, Simone Cristina Loures  
Estudo comparativo de álcool utilizando a *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida / Simone Cristina Loures Pereira. -- Guarapuava, 2014  
xiv, 101 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, 2014

Orientador: Paulo Rogério Pinto Rodrigues  
Banca examinadora: Augusto Celso Antunes, Cynthia Beatriz Furstemberger

Bibliografia

1. Bioenergia. 2. Biocombustíveis. 3. Bioetanol. 4. Amido. 5. Hidrólise. 6. Tiririca. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia.

CDD 660

SIMONE CRISTINA LOURES PEREIRA

ESTUDO COMPARATIVO DE ÁLCOOL UTILIZANDO A *Cyperus  
esculentus* VIA ROTA ENZIMÁTICA E ÁCIDA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 31 de março de 2014.

Prof. Dr. Augusto Celso Antunes – UEPG

Prof(a). Dr(a). Cynthia Beatriz Furstemberger - UNICENTRO

Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues  
Orientador

GUARAPUAVA-PR

2014

*Dedico a minha família  
pelo apoio, paciência,  
carinho e compreensão nos  
momentos de angústia.*

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente a DEUS, por tudo que tem me proporcionado nesta caminhada.
- ✓ Ao meu orientador Prof.º Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo acompanhamento, pela amizade e principalmente pelo voto de confiança e incentivo, por ter acreditado no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!
- ✓ À minha família, sempre presente nos momentos decisivos pessoas que tanto amo. Ao meu esposo Giovane, pela compreensão, carinho, paciência e apoio ao longo da condução de todo esse mestrado. A minha filha, Tauany pela paciência, amor e carinho.
- ✓ Aos meus pais, José Carlos e Eva, pelo apoio durante toda esta caminhada.
- ✓ Ao André L. Gallina, pela amizade, paciência, disposição de ajudar e transmitir seus conhecimentos, com quem sempre pude contar. Acompanhou de perto todos os resultados, as trocas de idéias, parceria, discussões, pelas contribuições durante a realização deste mestrado.
- ✓ Um agradecimento especial à minha irmã Soriane, pelo apoio incondicional em todos os momentos, incentivo, dedicação, discussões e paciência, por estar sempre disponível para ajudar durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!
- ✓ À Aline Viomar pelo carinho e incentivo.
- ✓ Ao Douglas Santos Oliveira.
- ✓ A todos que, contribuíram de forma direta ou indiretamente na realização deste trabalho, que caracteriza mais uma etapa de crescimento em busca do conhecimento. Meu muito obrigado!

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém  
Tem gente que machuca os outros  
Tem gente que não sabe amar  
Mas eu sei que um dia a gente aprende  
Se você quiser alguém em quem confiar  
Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança!”*

*Renato Russo*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELA.....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Energia.....	5
3.1.1 Tipos de Energia.....	6
3.1.1.1 Energias não renováveis .....	6
3.1.1.2 Energias renováveis.....	7
3.1.2 Consumo energético .....	8
3.2 Tipos de Biocombustíveis .....	10
3.2.1 Biodiesel .....	10
3.2.2 Biometanol .....	12
3.2.3 Biogás .....	12
3.2.4 Bioetanol.....	13
3.2.5 Matérias-primas.....	14
3.2.5.1 Considerações sobre a matéria-prima.....	24
3.2.5.1.1 Tiririca ( <i>Cyperus esculentus</i> ).....	24
3.3 Amido .....	27
3.3.1 Composição química do amido .....	28
3.3.1.1 Amilose.....	29
3.3.1.2 Amilopectina .....	30
3.3.1.3 Outros constituintes do amido .....	31
3.3.2 Estrutura Granular .....	32
3.3.3 Gelatinização .....	33
3.3.3.1 Hidrólise do material amiláceo.....	34
3.3.3.1.1 Hidrólise enzimática .....	35
3.3.3.1.2 hidrólise ácida.....	36
3.4 Enzimas .....	37
3.4.1 Enzimas amilolíticas.....	38



3.4.1.1 Alfa-amilase.....	39
3.4.1.2 Amiloglucosidase .....	39
3.5 Fermentação.....	40
3.5.1 Fatores que afetam a fermentação .....	41
3.6 Levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	42
3.7 Planejamento Experimental.....	43
3.8 Espectrofotometria UV-Vis.....	44
3.9 Análises das propriedades físico-químicas.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Local do experimento .....	45
4.2 Caracterização da matéria-prima .....	45
4.2.1 Determinação da umidade .....	45
4.2.2 Determinação de açúcares redutores .....	46
4.2.3 Determinação de amido .....	50
4.3 Processos de obtenção do etanol .....	52
4.3.1 Hidrólise .....	52
4.3.1.1 Hidrólise enzimática.....	53
4.3.1.1.1 Preparo do mosto.....	55
4.3.1.1.2 Ensaio de fermentação .....	55
4.3.1.2 Hidrólise ácida.....	56
4.3.1.2.1 Preparo do mosto.....	58
4.3.1.2.2 Ensaio de fermentação .....	58
4.4 Destilação .....	58
4.5 Teor alcoólico.....	60
4.5.1 Espectrofotometria UV-Vis.....	60
4.6 Análises físico-químicas das amostras de etanol.....	61
4.6.1 Cor e aspecto .....	61
4.6.2 Potencial Hidrogênionico (pH).....	62
4.6.3 Massa específica .....	62
4.6.4 Condutividade.....	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1 Caracterização da farinha de Tiririca.....	64
5.1.1 Teor de umidade .....	64
5.1.2 Teor de amido.....	64

5.1.3 Teor de açúcares redutores .....	65
5.2 Ensaio de fermentação .....	66
5.2.1 Rota enzimática .....	66
5.2.1.1 Planejamento experimental .....	68
5.2.2 Rota ácida .....	73
5.3 Análises físico-químicas do etanol de Tiririca .....	76
5.3.1 Rota Enzimática.....	76
5.3.2 Rota Ácida .....	77
5.4 Estudo de viabilidade econômica hidrólise ácida e enzimática.....	78
5.5 Análise social.....	83
5.6 Análise ambiental .....	84
6. CONCLUSÕES .....	85
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
APÊNDICE .....	99
ANEXOS .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Energia não renovável.....	6
Figura 2 – Energia da biomassa.....	7
Figura 3 – Oferta interna de energia.....	9
Figura 4 – Matéria-prima para a produção de biodiesel.....	11
Figura 5 – Produção de Biogás.....	13
Figura 6 - Matéria-prima para a produção de bioetanol.....	15
Figura 7 – Representação esquemática do ciclo de produção de etanol.....	19
Figura 8 – <i>Cyperus esculentus</i> .....	24
Figura 9 – Distribuição geográfica da <i>Cyperus esculentus</i> .....	25
Figura 10 – Polissacarídeos constituintes do amido.....	29
Figura 11 – Estrutura química da amilose.....	29
Figura 12 – Representação da estrutura helicoidal da amilose.....	30
Figura 13 – Estrutura da amilopectina.....	31
Figura 14 – Grânulos de amido de diferentes fontes botânicas.....	32
Figura 15 – Hidrólise enzimática do amido.....	38
Figura 16 – (A) Moinho de facas; (B) Farinha de <i>Cyperus esculentus</i> .....	46
Figura 17 – Soluções de Fehling A e B.....	47
Figura 18 – Fluxograma para a padronização dos Fehling A e B.....	48
Figura 19 – Fluxograma determinação de açúcares redutores.....	49
Figura 20 – (A) titulação; (B) Ponto de viragem.....	49
Figura 21 – Fluxograma representativo do preparo das amostras para a determinação de amido.....	51
Figura 22 – Fluxograma das etapas do processo fermentativo.....	52
Figura 23 – Hidrólise do material amiláceo em banho termostático.....	53
Figura 24 – Fluxograma hidrólise enzimática.....	54
Figura 25 – Amostras no banho termostático (hidrólise ácida).....	57
Figura 26 – Amostras autoclavadas.....	57
Figura 27 – Aparato de destilação.....	59
Figura 28 – Picnômetro.....	62
Figura 29 – Curva de calibração rota enzimática.....	67
Figura 30 – Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da $Y_1$ (concentração) e $Y_2$ (tempo reacional) com $Y_3$ (centrifugação).....	69

Figura 31 - Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da $Y_1$ (concentração) e $Y_2$ (tempo reacional) com $Y_3$ ( sem centrifugação).....	70
Figura 32 - Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da $X_1$ (concentração de levedura) e $X_2$ (tempo reacional).....	72
Figura 33 – Curva de calibração rota ácida .....	73
Figura 34 - Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da $Y_1$ (temperatura) e $Y_2$ (tempo reacional) para o ácido nítrico .....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz energética mundial .....	8
Tabela 2 – Participação de renováveis na matriz energética .....	9
Tabela 3 – Matérias-primas para a produção de bioetanol e seus comparativos de potencial de produção.....	21
Tabela 4 – Representação da quantidade de amido .....	27
Tabela 5 – Análise multivariada.....	55
Tabela 6 – Intervalo das variáveis no processo de hidrólise .....	56
Tabela 7 – Teores de massa fresca, seca e água dos tubérculos .....	64
Tabela 8 – Teores de amido dos tubérculos .....	65
Tabela 9 – Teores de açúcares redutores dos tubérculos.....	66
Tabela 10 – Teores alcoólicos rota enzimática.....	67
Tabela 11 – Análise dos efeitos principais para a fermentação da farinha de <i>Cyperus esculentus</i> rota enzimática a partir do planejamento fatorial .....	68
Tabela 12 – Resultados dos teores alcoólicos do planejamento fatorial .....	71
Tabela 13 – Análise dos efeitos principais para o grau alcoólico de <i>Cyperus esculentus</i> via rota enzimática a partir do segundo planejamento fatorial .....	71
Tabela 14 – Teores alcoólicos rota ácida HNO <sub>3</sub> .....	74
Tabela 15 – Análise dos efeitos principais para o ácido nítrico a partir do planejamento fatorial.....	75
Tabela 16 – Comparativo dos teores alcoólicos rota ácida e enzimática .....	78
Tabela 17 – Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para o cultivo de um ano da farinha de tiririca.....	79
Tabela 18 – Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para a produção de um ano de bioetanol de tiririca via rota enzimática.....	80
Tabela 19 - Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para a produção de um ano de bioetanol de tiririca via rota ácida.....	81
Tabela 20 – Projeção econômica financeira para a produção de bioetanol derivado da tiririca, via rota ácida, após três anos de subsídio e minimização dos custos .....	82

## RESUMO

PEREIRA, Simone Cristina Loures. **Estudo Comparativo de álcool utilizando a *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida. 2014. 101 p.** Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2014.

O avanço da economia mundial desafia o abastecimento energético na busca por energias mais limpas, provenientes de fontes renováveis. O etanol proveniente da biomassa ocupa lugar de destaque entre os biocombustíveis. No Brasil é produzido a partir da biomassa da cana-de-açúcar, porém, esta vem sendo priorizada para a produção de açúcar pelas indústrias sucroalcooleiras, novas estratégias vêm sendo pesquisadas visando o oferecimento de culturas alternativas para a produção do etanol. Este trabalho objetivou a produção de etanol a partir da fermentação da farinha de *Cyperus esculentus* como matéria-prima amilácea. Esta erva daninha possui características singulares e considerável teor de amido, que pode ser transformado em açúcares fermentescíveis para a obtenção do bioetanol. Empregaram-se as técnicas – teor de umidade, teor de amido e açúcares redutores encontrados na farinha de *Cyperus esculentus*, hidrólise do material amiláceo por duas diferentes rotas, química e enzimática, fermentação, destilação, espectrofotometria UV-Vis e discussão de dados estatísticos realizados de acordo com fatoriais  $2^2$  do planejamento experimental. Os resultados foram tratados utilizando o software Design Expert®, versão 8 sendo a resposta em teor de álcool, °GL. Os mostos fermentados resultaram em teor alcoólico médio de 29,08 °GL para os hidrolisados enzimáticos, enquanto os hidrolisados ácidos utilizando  $\text{HNO}_3$  forneceram valor igual a 26,0 °GL. O planejamento demonstrou valores significativos de fermentação em tempos de 24 horas e concentração de *Saccharomyces cerevisiae* igual a 15  $\text{gL}^{-1}$ . Os resultados demonstraram um melhor rendimento utilizando-se a rota enzimática, fato já esperado devido à seletividade da enzima, entretanto a produção pela rota ácida apresenta um custo 95% menor do que a enzimática, o que a tornaria viável com inserção de subsídios.

Palavras-chave: Bioetanol. Amido. Hidrólise. Tiririca.

## ABSTRACT

PEREIRA, Simone Cristina Loures. **The Comparative study of alcohol using the *Cyperus esculentus* by the enzymatic and acid route.** 2014. 101 p. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) - Midwest State University, Guarapuava. 2014.

The advancement of the global economy challenges the energy supply in searching for cleaner energy from renewable sources. Ethanol from biomass takes a distinguished place among the biofuels. In Brazil is produced from the sugarcane biomass, however, it has been prioritized the production of sugar by the sugarcane industries, new strategies are being researched aiming to offer alternative crops to the ethanol production. The objective of this work was the ethanol production from the fermentation of *Cyperus esculentus* flour as raw material from the starch. This weed has unique features and presents considerable starch content, which can be converted into fermentable sugars in order to obtain ethanol. The following techniques were employed - the moisture content, the starch content and the reducing sugars found in the flour of *Cyperus esculentus*, the hydrolysis of starch material by two different routes, chemical and enzymatic, fermentation, distillation, UV-Vis spectroscopy and the discussion of statistical data carried out according to the factorials  $2^2$  experimental planning. The results were processed using the software Design Expert®, version 8 and the response in alcohol content, °GL. The fermented mashes resulted in average alcohol content of 29,08 °GL to the enzymatic hydrolysis, while the acid hydrolysis using  $\text{HNO}_3$  provided value equal to 26,0 °GL. The planning showed significant values of fermentation in periods of 24 hours and a concentration of *Saccharomyces cerevisiae* equal to  $15 \text{ gL}^{-1}$ . The results showed a better performance using the enzymatic route, what was already expected due to the enzyme selectivity, however the production by the acid route features a 95% lower cost than the enzymatic which would become viable with the insertion of subsidies.

Keywords: Bioethanol. Starch. Hydrolysis. Tiririca.

## 1. INTRODUÇÃO

O contato do homem com a energia data desde 500.000 A.C. através do domínio do fogo, com esta constituindo-se desde então como um item fundamental para o desenvolvimento de uma nação. A era dos combustíveis fósseis iniciou-se com a Revolução Industrial, momento em que se intensifica o uso destes, com a consagração do Petróleo como principal fonte energética, fato que torna o crescimento da economia mundial dependente de seu emprego (OLIVEIRA; SUARES; SANTOS, 2008; GOLDEMBERG, 2009).

Com a ampla utilização destes combustíveis grandes quantidades de gases poluentes (enxofre, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos e fuligem) passaram a ser emitidos na atmosfera, gerando impactos ambientais que acarretaram em grandes consequências aos ecossistemas e à sociedade, como o aquecimento global e as mudanças climáticas decorrentes a este, a chuva ácida, a poluição de solos e rios e o aparecimento de problemas respiratórios na população (FAPESP, 2010).

A procura por outras fontes energéticas, visando o abastecimento do mercado decorrente do crescimento econômico e tecnológico, torna-se um desafio a ser enfrentado em todo o mundo. Os impactos ambientais se caracterizam como uma ameaça real e exigem uma resposta imediata no que se refere ao encontro de maneiras para solucioná-los, e ainda a fim de se garantir que a demanda energética futura seja suficiente sem, contudo, levar a mais prejuízos (BIOENERGIA, 2004; CARDOSO e SOUZA, 2005; FAPESP, 2010).

Os combustíveis de origem fóssil, além de grandes poluidores como já citado anteriormente, caracterizam-se também como fontes energéticas não renováveis gerando assim incertezas com relação as suas reservas, visto que estas se encontram ameaçadas pelo esgotamento (OLIVEIRA; SUARES; SANTOS, 2008). Deste modo, a procura por fontes alternativas de energia, renováveis e menos poluentes, vem se intensificando no setor energético e em vários países encontra-se no topo dos objetos das políticas públicas locais (SALLA, 2010).

Os chamados biocombustíveis surgem com a finalidade de substituir, parcial ou mesmo totalmente os combustíveis não renováveis (COLETTI, 2005; ANP, 2011). Caracterizam-se como renováveis porque são obtidos a partir de fontes ou reservas naturais que possuem a capacidade de renovação, além disso, quando comparados aos combustíveis fósseis, poluem menos, devido à emissão de poluentes ser menor durante a queima nos



motores, minimizando conseqüentemente os impactos ambientais, tornando-se uma grande opção estratégica para a produção energética (BIOENERGIA, 2004).

Seus principais representantes são o biodiesel, o etanol e o biogás, de modo que no Brasil destacam-se o emprego de duas destas fontes, o biodiesel e o etanol. Desde a década de 1970, a produção do etanol no país tem sido uma alternativa ecológica capaz de gerar emprego e renda. Os primeiros passos rumo à produção de etanol foram dados pós-crise do petróleo com o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) e, mais tarde, tem-se um novo crescimento em sua produção decorrente da introdução dos veículos flex no mercado brasileiro. Atualmente, o país configura-se como um de seus maiores produtores, sendo extraído de forma dominante a partir da cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*). Outras fontes para a sua obtenção são o milho, a exemplo dos Estados Unidos (EUA), a beterraba, na Europa, a mandioca, na Ásia, a batata-doce e o trigo, porém, discussões são geradas a respeito da cultura destes para a obtenção de álcool por fazerem parte da cadeia alimentar, o que dificulta a ocorrência de grandes avanços em seu alcance. Desse modo, é fundamental a realização de pesquisas que visem o aperfeiçoamento de suas matérias-primas, buscando-se a concretização dos biocombustíveis na matriz energética mundial (COLETTI, 2005; GOLDEMBERG, 2009; ANP, 2011).

Neste sentido, a tiririca (*Cyperus esculentus*), uma erva daninha conhecida também com outras denominações como batatinha-de-junça, cebolinha, junça e tiriricão, possuidora de características particulares, dentre as quais grande capacidade de reprodução podendo desenvolver-se em inúmeros tipos de solos, o que a torna uma das espécies mais impregnantes nas lavouras, bem como o fato de não estar inclusa na cadeia alimentar, apresenta-se como uma importante estratégia para o alcance de aumentos na produção de etanol, contribuindo assim para redução dos desequilíbrios ambientais (KUVA et al., 2000; LORENZI, 2000).

Para a produção de etanol, é necessário que o amido encontrado nos tubérculos da tiririca passe pelo processo de hidrólise, possibilitando a quebra de sua molécula, e posteriormente fermentação alcoólica para a produção final do biocombustível. O processo de hidrólise do amido pode ser obtido de duas formas, por rota enzimática, onde são utilizadas enzimas (amiloglucosidase e  $\alpha$ -amilase), e por rota ácida, onde empregando ácido nítrico  $12 \text{ molL}^{-1}$ . A fermentação alcoólica envolve a ação de microorganismos denominados leveduras, responsáveis pela fermentação destes açúcares, necessitando condições favoráveis de temperatura e pH. O fungo *Saccharomyces cerevisiae* é o microorganismo agente de fermentação mais empregado neste processo (NOVAES et al., 1974).

Assim sendo, diante dos problemas de ordem ambiental e da crise energética emergente, um percurso alternativo precisa ser traçado, buscando uma energia mais limpa e renovável, sem degradação e focando-se num desenvolvimento com sustentabilidade.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Produzir etanol a partir da fermentação da farinha de *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida.

### Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar as concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* e tempos de fermentações na produção de etanol;
- ✓ Obter o teor alcoólico por meio da NBR 13920 e analisar a rentabilidade das rotas enzimática e ácida;
- ✓ Analisar o custo benefício da produção de etanol a partir da hidrólise do material amiláceo, utilizando a *Cyperus esculentus* como matéria-prima, via rota enzimática e ácida.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Energia

A energia é um motor essencial no crescimento econômico e social de uma nação. Todavia, a sua produção e consumo vêm comprometendo o equilíbrio entre meio ambiente e sociedade (FAPESP, 2010). Com o domínio do fogo por volta de 500.000 A.C., o homem passou a empregá-lo como fonte de aquecimento, proteção e iluminação, utilizando a madeira como combustível. A era dos combustíveis fósseis, marcada pela introdução da utilização do carvão mineral, iniciou-se após a Revolução Industrial, neste período o petróleo consagrou-se como a principal fonte de energia em todo o mundo (BORSATO; GALÃO; MOREIRA, 2005; OLIVEIRA; SUARES; SANTOS, 2008).

Com o uso das máquinas a vapor no período da Revolução Industrial, a demanda de carvão que até então era considerada pequena, sendo destinada apenas como fonte de aquecimento nas residências, passou por um aumento significativo e a partir desse período o petróleo e o gás tornaram-se dominantes por serem fáceis de transportar, passando a ser utilizados como combustíveis em motores de combustão interna (Ciclo Otto ou Diesel). A partir daí a energia passou a ser foco do desenvolvimento, havendo a transformação do trabalho humano ou animal para equipamentos movidos com carvão mineral. O petróleo passou a ser a base para o desenvolvimento tecnológico e a economia mundial tornou-se dependente do então denominado “ouro negro” (BORSATO; GALÃO; MOREIRA, 2005; GOLDEMBERG, 2009).

Esta dependência associada ao aumento da economia mundial fez com que se elevasse cada vez mais a emissão de gases poluentes (enxofre, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos e fuligem), contribuindo para a formação de materiais particulados, cooperando com o efeito estufa e a chuva ácida. Além disso, a extração, o transporte e o processamento de energias pertencentes às fontes primárias estão interligadas a vários riscos de degradação do solo, da água e do ecossistema como um todo. Deste modo, surge a necessidade de buscar um sistema energético com teor de carbono reduzido (BORJESSON, 1996; FAPESP, 2010).

As mudanças climáticas associadas ao aquecimento global se caracterizam como uma ameaça real, exigindo uma resposta imediata no que se refere ao encontro de uma solução, a fim de se garantir a demanda futura de energia diante do acréscimo nas temperaturas globais e da dependência humana (BIOENERGIA, 2004; FAPESP, 2010).

### 3.1.1 Tipos de Energia

#### 3.1.1.1 Energias não renováveis

Este tipo de energia assim denomina-se por ser obtida a partir de fontes que apresentam capacidade de regeneração (renovação) muito inferior quando comparada à sua grande utilização, isto é, a demanda intensa supera a sua obtenção, levando conseqüentemente ao esgotamento de suas reservas. Estas fontes não renováveis de energia compreendem os combustíveis fósseis, o petróleo, com maior representação, o gás natural, o carvão e o urânio. A figura 1 apresenta algumas fontes não renováveis de energia (SALLA, 2010; GALLINA, 2011).



**Figura 1** – Energia não renovável (<http://www.neosolar.com.br/images/saiba-mais/energias-renovaveis.jpg>).

Além de se tratarem de fontes esgotáveis de energia, os combustíveis fósseis são os grandes responsáveis pelos problemas ambientais enfrentados pela humanidade, incluindo o aquecimento global e as mudanças climáticas associadas. O petróleo caracteriza-se no composto químico que mais emite gases poluentes na atmosfera, além disso, a maioria de suas jazidas se encontra em áreas geográficas politicamente conturbadas, provocando grandes alterações em seu custo, de maneira que estas questões contribuem significativamente com as desvantagens em seu emprego (OLIVEIRA; SUARES; SANTOS, 2008).

### 3.1.1.2 Energias renováveis

A energia renovável, como o próprio nome revela, é proveniente de fontes ou reservas naturais, que possuem capacidade de regeneração, isto é, se renova num ritmo capaz de suportar a sua demanda, sem o risco de esgotamento. Os biocombustíveis derivados destas fontes energéticas poluem menos quando comparados aos combustíveis fósseis por emitirem compostos em menor quantidade durante o processo de combustão nos motores (BIODIESELBR, 2012).

As plantas das quais são obtidos os biocombustíveis absorvem dióxido de carbono ( $\text{CO}_{2(g)}$ ) do ar através do processo da fotossíntese, auxiliando na redução do efeito estufa e na compensação deste emitido durante o processo de combustão nos motores. Estas características, associadas ao esgotamento das reservas dos combustíveis fósseis, fazem com que os biocombustíveis sejam superiores na competição do mercado global de energia.

A energia obtida por meio da biomassa (figura 2) pode gerar biocombustíveis nos principais estados físicos da matéria, apresentando um amplo campo de aproveitamento no setor energético (COLETTI, 2005; ZHANG et al., 2010; ANP, 2011; BIODIESELBR, 2012).



**Figura 2** - Energia da biomassa (<http://fontesenergeticasambiental2011.blogspot.com.br/2011/05/energia-da-biomassa.html>).

A produção de biocombustíveis surge, portanto, como importante opção estratégica, quer seja para seu emprego como produto complementar, quer seja como produto substituto aos derivados do petróleo, minimizando assim os problemas ambientais decorrentes de seu uso (BIOENERGIA, 2004).

### 3.1.2 Consumo energético

Nos dias atuais, o desenvolvimento da economia mundial esta interligado com a capacidade de produção de energia, sendo esta determinada por fatores ambientais, econômicos e sociais, uma vez que o seu uso afeta toda a sociedade. A dependência nos combustíveis fósseis leva a necessidade de produção de energia proveniente de fontes renováveis para sanar a demanda energética das nações, proporcionando crescimento aos países em desenvolvimento (SILVA e FREITAS, 2008; SALLA, 2010). A procura por fontes alternativas de energia vem se intensificando no setor energético e em vários países tem sido foco de políticas públicas. Por outro lado, no que se refere ao balanço energético mundial, sua representação ainda é inferior à energia fóssil (MME, 2013).

As gerações dependem da capacidade energética para o seu desenvolvimento social, econômico e ambiental. A incerteza quanto às reservas petrolíferas e o aumento das cotações de petróleo, associados às questões ambientais e sociais, impõem a premência de se alterar as bases do desenvolvimento econômico e de se modificar a matriz energética mundial. Segundo estudos científicos realizados no decorrer dos últimos 30 anos, o aumento na concentração dos gases responsáveis pela geração do efeito estufa, de modo especial o CO<sub>2(g)</sub> resultante da combustão de combustíveis fósseis, provocará um aumento na temperatura média do planeta, situando-se entre 1,4°C e 5,8°C nos próximos 100 anos (ALLEY et al., 2007).

A matriz energética mundial, tabela 1, é representada em sua maioria por combustíveis fósseis, com maior parcela de petróleo, seguida de carvão e gás natural.

**Tabela 1** – Matriz energética mundial.

<b>FONTES</b>	<b>(%)</b>
Petróleo	32
Carvão	28
Gás Natural	21
Energia Nuclear	5
Energia Hidráulica	2
Outras	12

Fonte: MME 2013

Em se tratando do cenário nacional (figura 3), apesar do consumo energético também trazer índices superiores nas fontes de carbono fóssil quando comparado às fontes renováveis, estas vêm aumentando sua representatividade.

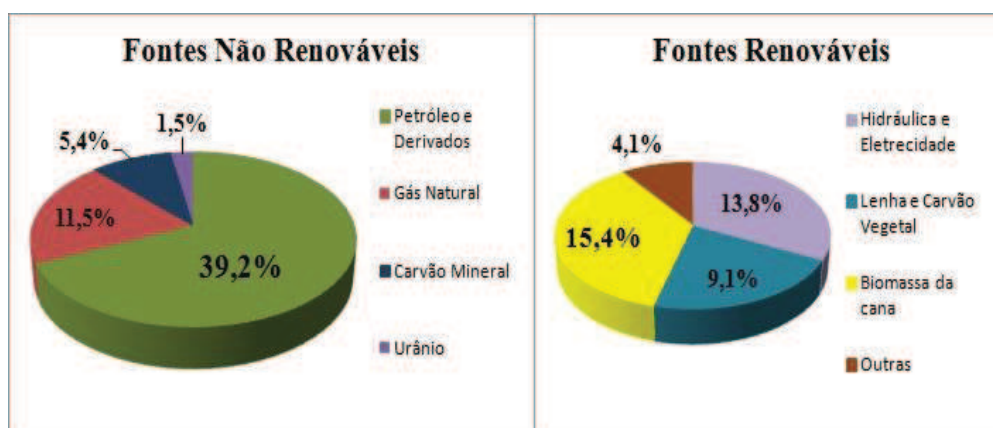


Figura 3 – Oferta interna de energia (BEN, 2013).

O Brasil apresenta um conjunto de vantagens se comparado a outros países para se tornar um líder na agricultura de energia, citando-se a existência de grandes áreas disponíveis de terras para produção associada à existência de uma grande bacia hidrográfica com inúmeros rios de planaltos, essenciais para a geração de energia (BIOENERGIA, 2004). A tabela 2 apresenta a participação das fontes renováveis na matriz energética brasileira no ano de 2012, observa-se uma considerável diferença embora tenha ocorrido uma pequena redução na oferta de etanol, em comparação a outras matrizes energéticas (anos anteriores).

Tabela 2 - Participação de renováveis na matriz energética.

	Renováveis (%)	Não Renováveis (%)
Brasil (2012)	42,4	57,6
Brasil (2011)	44,1	55,9
Brasil (2010)	45,1	54,9
Mundo (2010)	13,2	86,8
OCDE (2010)	8,0	92,0

Fonte: BEN 2013

Com relação ao uso dos biocombustíveis, o Brasil está fazendo sua parte, destacando-se o uso do biodiesel, obtido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais, e o etanol, extraído a partir da biomassa da cana-de-açúcar, de modo que esta vem dominando atualmente sua produção no país (COLETTI, 2005; ANP, 2011).



### 3.2 Tipos de Biocombustíveis

De uma forma geral, os biocombustíveis, são produzidos a partir de açúcares, amido, celulose, óleos vegetais e gorduras animais. Os processos de produção ocorrem por meio de tecnologias aprovadas e estabelecidas, mas diversos estudos vêm sendo realizados visando o emprego de novos métodos para este fim. Embora ocorra semelhante absorção do  $\text{CO}_{2(g)}$  durante o crescimento dos grãos à sua obtenção, fato que neutraliza, ainda que em níveis distintos, as emissões provenientes do cultivo, processamento e queima nos veículos, os biocombustíveis comportam-se de maneiras distintas por possuírem características diferenciadas. Dentre estes compostos merecem destaque o biodiesel, o biogás, o biometanol e o bioetanol (DAMASCENO et al., 2010; BIODIESELBR, 2012).

Apesar de se encontrarem em fase de pesquisa e desenvolvimento, para avaliação no que se refere à viabilidade econômica de seu uso, o emprego dos novos métodos pode contribuir para um aumento na produção de biocombustíveis, além de que, o aumento da utilização da biomassa para a produção de energia poderá possibilitar um maior desenvolvimento econômico, bem como uma diminuição da pobreza por meio da geração de empregos e melhorias na vida das populações residentes nas áreas rurais (DAMASCENO et al., 2010).

#### 3.2.1 Biodiesel

A queima deste biocombustível libera gás carbônico, um dos responsáveis pelo efeito estufa, porém tal gás é absorvido pelas plantas oleaginosas utilizadas como matéria-prima para sua produção, por meio do processo denominado fotossíntese. O ciclo de produção do biodiesel minimiza os impactos ambientais. No entanto, para que a cadeia de produção seja completamente renovável, faz-se necessário o uso de uma rota etanólica, evitando a utilização da rota metanólica (GALLINA, 2010).

Produzido a partir de plantas oleaginosas (figura 4) como algodão, amendoim, girassol, dendê e soja, ou ainda de matérias-primas alternativas como a gordura animal e os óleos de frituras, através do método denominado transesterificação, no qual há a separação da molécula de glicerina das moléculas de ácido graxo. É adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis destacando-se assim na minimização do uso dos derivados do petróleo sem modificar motores (COLETTI, 2005; BIODIESELBR, 2012).



**Figura 4** - Matéria-prima para produção de biodiesel (GALLINA, 2011; adaptado por, PEREIRA, 2014).

No Brasil, as técnicas desenvolvidas pela Petrobrás para se obter o combustível orgânico se encontram em desenvolvimento avançado, visto que já vem sendo utilizado em veículos nacionais, demonstrando a substituição gradativa dos combustíveis fósseis, pois sua utilização produzindo índices baixos de poluição, além de proporcionar uma menor dependência econômica do petróleo.

Após o surgimento do PROÁLCOOL o desenvolvimento de substitutos ao diesel enfatizou-se, pois seria mais uma alternativa para a redução do consumo de petróleo. Porém, o baixo preço do diesel acarretou na estagnação deste processo. A substituição em partes da gasolina pelo etanol causou um desequilíbrio nas refinarias, refletindo na qualidade do diesel, ocasionando na importação de 20% do diesel consumido no país e em consequência a exportação de parte da gasolina produzida (OBERLING, 2008; LEITE; LEAL, 2007).

Houve interesse governamental pelo biodiesel quando aumentou na Europa a produção e o consumo deste. Dessa maneira, a agricultura familiar seria fortalecida melhorando-se a inclusão social. O pequeno produtor foi favorecido por benefícios fiscais diferenciados na produção de matérias-primas para produção de biodiesel, através do Selo Social. Foi lançado então oficialmente em dezembro de 2004 o Programa Nacional de Produção de e uso do Biodiesel (PNPB), amparado pela Lei nº 11.097, de 2005. Com este programa passou a ser obrigatório o uso de 2% de biodiesel no diesel comum e, a partir de 2013 a porcentagem obrigatória passou para 5% (LEITE; LEAL, 2007).

### 3.2.2 Biometanol

O biometanol, ou álcool metílico, ou ainda hidrato de metilo, é o metanol produzido a partir da biomassa da madeira, por meio do processo de destilação da mesma, podendo ser obtido também através da destilação da cana-de-açúcar e de gases fósseis. É empregado como solvente industrial (para diluição de sais), na fabricação de plástico, produção de biodiesel, preparação de hormônios, fabricação de produtos químicos, na indústria farmacológica, entre outros. Configura-se como um biocombustível muito inflamável, sendo mais tóxico que o etanol e, portanto, poluindo mais o meio ambiente. Entre outras desvantagens, em sua combustão são produzidas chamas bem claras que atrapalham no controle do fogo, além de outros problemas que pode gerar a saúde, como vômito, cegueira, câncer (FIGUEIREDO e FILHO, 2009).

### 3.2.3 Biogás

Gás combustível obtido a partir da mistura de dióxido de carbono e metano, por meio da ação de bactérias fermentadoras, que realizam a decomposição anaeróbia desta mistura, ocorrendo em determinados valores de temperatura, umidade e acidez de biomassa ou fragmentos biodegradáveis de resíduos que, após passarem por processo de purificação, alcançam a qualidade de gás natural. O processo de produção é realizado com matéria orgânica em um aparelho denominado biodigestor anaeróbico (figura 5), de modo que estes biodigestores são instalados, sobretudo nas áreas rurais, pois a maioria dos gases tem um cheiro forte e desagradável (GOLDEMBERG, 2009).



**Figura 5** - Produção de biogás (<https://www.ambienteenergia.com.br>).

A energia do biogás produzida em aterros sanitários, em estações de tratamento de esgoto e em terrenos com tratamento do estrume é economicamente viável, considerando que seu custo para produção é baixo, beneficiando também com os créditos de carbono provenientes do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Esse meio de produção de energia auxilia na redução de gases metano, que contribuem significativamente com o efeito estufa, bem como colabora na redução do uso de combustíveis fósseis (BIOENERGIA, 2004; GOLDEMBERG, 2009).

#### 3.2.4 Bioetanol

A atividade canavieira no Brasil tem início no século XVI, sendo desenvolvida basicamente na região nordeste devido à existência de condições favoráveis para o plantio da cana e a proximidade com o mercado europeu, importante centro consumidor do açúcar. Em meados do século XVII, o país tornou-se o maior produtor de cana no mundo, num ciclo que decorreu cerca de 150 anos. No final da década de 1920, devido à crise de 1929, ocorreu a difusão do plantio da cana no Estado de São Paulo, onde as grandes fazendas de café foram convertendo-se em produtoras de açúcar, passando então a competir pela exportação e comercialização do produto com a região nordeste. Este fato leva o Estado brasileiro a criar o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), que passou a exercer domínio sobre os preços dos

produtos. Na década de 1970 surge um novo ciclo de produção do álcool em decorrência de crises do petróleo, que propicia avanços tecnológicos no setor agroindustrial canavieiro após o surgimento do PROÁLCOOL (LACHEFSKY; TEIXIERA, 2006; NOVAES et al., 1974).

### 3.2.5 Matérias-primas

O termo álcool é a nomenclatura comum do álcool etílico ou etanol, que possui fórmula química  $C_2H_5-OH$ , está presente nas bebidas alcoólicas e é produzido por meio dos processos de fermentação e destilação de açúcares provenientes da cana-de-açúcar, beterraba e frutas, ou ainda do amido, citando-se o milho, trigo, batata e a mandioca (figura 6). O etanol caracteriza-se por ser um líquido de baixa toxidez, com odor característico, incolor e inflamável. Diferencia-se da gasolina por conter oxigênio em sua estrutura química, sendo por isso comumente chamado de combustível oxigenado, característica que possibilita a sua queima no motor de forma mais completa, resultando, portanto, em menor emissão de poluentes (LIMA et al., 2001).

No Brasil, é produzido a partir da biomassa da cana-de-açúcar, por se tratar de uma planta que apresenta alta produtividade agrícola e poucas restrições em seu plantio. Futuramente, devido aos avanços observados no campo da biotecnologia, é possível que sua produção aconteça em escala comercial e a custos competitivos a partir de materiais que contêm celulose e hemi-celulose, citando-se o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, além de materiais amiláceo, como o milho e a mandioca, podendo gerar um aumento substancial em sua produtividade (ARAÚJO, 2008; SOUTO; QUIRINO, 2010).





**Figura 6** – Matérias-primas para a produção de bioetanol ([www.e-sinas.com.br/mini/Cana.aspx](http://www.e-sinas.com.br/mini/Cana.aspx)).

Os produtos energéticos da cana, etanol e bagaço, têm contribuído consideravelmente no país para a redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE), sendo considerada uma das melhores alternativas para esta redução. Quando comparado ao etanol em outros países a partir de diferentes matérias-primas, o etanol brasileiro apresenta a maior redução de GEE, além de menor custo por tonelada de GEE evitado (IEA, 2006). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção avaliada para a cana ser moída pela indústria sucroalcooleira na safra 2013/14 alcançou o valor de 652 milhões de toneladas, sendo a produtividade média em 74.100 Kg por hectare. Deste valor, foram destinados para a produção de açúcar 40,97 milhões de toneladas. A produção de etanol atingiu 27,17 bilhões de litros na safra 2013/14, deste volume 12,02 bilhões de litros de etanol anidro e 15,16 bilhões de litros de etanol hidratado. A maior área de plantio corresponde ao Estado de São Paulo, com 51,19 % da produção (CONAB, 2013).

Com a elaboração de leis ambientais que apontam à diminuição da emissão de gases decorrentes da queima da palha da cana, a mecanização do campo surgiu para diminuir este efeito. Todavia, a colheita executada de forma mecanizada implica num preparo diferenciado do solo e no plantio, decorrentes de dificuldades encontradas quando se tem um aumento dos desníveis, buracos e presença de obstáculos como pedras ou tocos, o que eleva os cuidados necessários à operação das colhedoras, refletindo-se em maiores perdas de matéria-prima,

aumento nos percentuais de matéria estranha e de manutenção das máquinas (CARDOSO, 2011).

O uso do etanol contribui para a redução da poluição atmosférica independente dos sistemas de controle de emissão, a emissão de  $SO_x$  sofre uma redução de 20 a 25% nos veículos movidos a gasolina, dependendo do teor de etanol adicionado a este combustível, a emissão de  $SO_x$  chega ser até 100 vezes menor que a da combustão da gasolina. Nos veículos *flex fuel*, quanto maior o emprego do etanol, maior a redução na emissão de gases poluentes. A emissão de materiais particulados (MP) é praticamente nula, devido a presença de dois átomos de carbono, fato este extremamente relevante. As partículas finas emitidas especialmente pelos veículos diesel caracterizam-se como a forma de poluição mais agressiva à saúde (RIBEIRO et al., 2007).

Por suas características, associadas aos avanços tecnológicos, o etanol se tornou um grande aliado na redução dos gases tóxicos lançados na atmosfera durante a combustão pelos motores de veículos automotivos, minimizando o efeito estufa, responsável por alterações climáticas em todo o mundo, sua demanda energética tem aumentado consideravelmente fazendo deste um produto competitivo em relação aos combustíveis fósseis (CARDOSO e SOUZA, 2005; BRASIL, 2007).

No período compreendido entre as décadas de 1970 e 1980, a ocorrência de crises mundiais relacionadas à utilização do petróleo induziu o Governo Brasileiro a investir no uso do etanol como combustível alternativo à gasolina. Programas para obtenção de combustíveis a partir de biomassa foram elaborados, ressaltando-se o PROÁLCOOL, criado em 14 de novembro de 1975 pelo decreto nº 76.593. O qual tinha como objetivo estimular a produção de álcool, iniciando com o aumento respectivo deste na gasolina, visto que o preço do petróleo estava consideravelmente alto, o que levou a um número elevado de déficits na economia brasileira. Num segundo momento, no período de 1979 a 1985, ocorreu uma evolução no programa que passou a promover o uso do etanol combustível em automóveis movidos a álcool, elevando significativamente a participação deste na matriz energética do país, substituindo assim o uso em parte da gasolina atendendo necessidades do mercado interno e externo, e também visando à redução de gastos com as importações de petróleo. Além disso, como o custo do açúcar havia decaído no mercado internacional, a mudança à produção de álcool quando comparada à de açúcar, tornou-se conveniente no Brasil (LACHEFSKY; TEIXIERA, 2006; OBERLING, 2008).

De acordo com o referido decreto de criação do programa, a produção do álcool a partir da cana-de-açúcar, da mandioca ou de qualquer outro insumo deveria ser incentivada

expandindo a oferta de matérias-primas, com ênfase no aumento da produção agrícola, na modernização e ampliação das destilarias existentes e na instalação de novas unidades produtoras, anexas às usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras (BRASIL, 1975).

Alguns anos mais tarde, a partir da década de 1980, alterações vieram a ocorrer no mercado petrolífero. Com a queda do preço dos barris de petróleo, gerando o período conhecido como “contrachoque do petróleo”, os programas para estimulação da obtenção de combustíveis de fontes energéticas renováveis foram afetados, além disso, ocorre também uma queda no fornecimento de recursos públicos aos produtores de álcool a fim de subsidiar tais programas, levando-se a um déficit na oferta deste combustível no país, indo contra a grande demanda necessária. Este fato acaba por gerar uma crise de abastecimento de etanol, o que afeta a confiabilidade no PROÁLCOOL no final desta década. Sem expectativa de prosseguimento, o programa ficou esquecido acarretando no afastamento do Estado em meados da década de 90, desregulamentando o setor sucroalcooleiro, com o etanol sendo deixado de lado por mais um período adiante (OBERLING, 2008).

No início do século XXI, o Brasil inicia uma nova ampliação dos canaviais objetivando um novo oferecimento, em grande escala, deste combustível alternativo. No entanto, este novo movimento recebe o comando da iniciativa privada, visto que esta passa a acreditar que o álcool exerceria um papel cada vez mais significativo como combustível renovável, tanto no mercado interno quanto externo (CASTRO, 2005).

Neste contexto, uma nova produção tecnológica proporciona uma expansão no consumo interno do álcool. Com o surgimento dos motores *flex fuel*, os novos veículos então produzidos passaram a utilizar tanto gasolina quanto o álcool, elevando assim o cenário nacional de consumo e demanda do etanol. Em decorrência dos elevados preços dos barris de petróleo internacionalmente, das diferentes tributações entre etanol e gasolina e da queda no que se refere ao custo de sua produção interna, a paridade no consumo destes dois combustíveis se intensifica, de modo especial na época da safra da cana-de-açúcar. O valor do uso de etanol como combustível ultrapassa as fronteiras nacionais e passa a ser reconhecido no panorama internacional. Os crescentes custos nos barris de petróleo e os debates em todo o mundo no que diz respeito às questões ambientais instigaram a procura por fontes energéticas renováveis, alternativas às provenientes dos combustíveis fósseis (OBERLING, 2008).

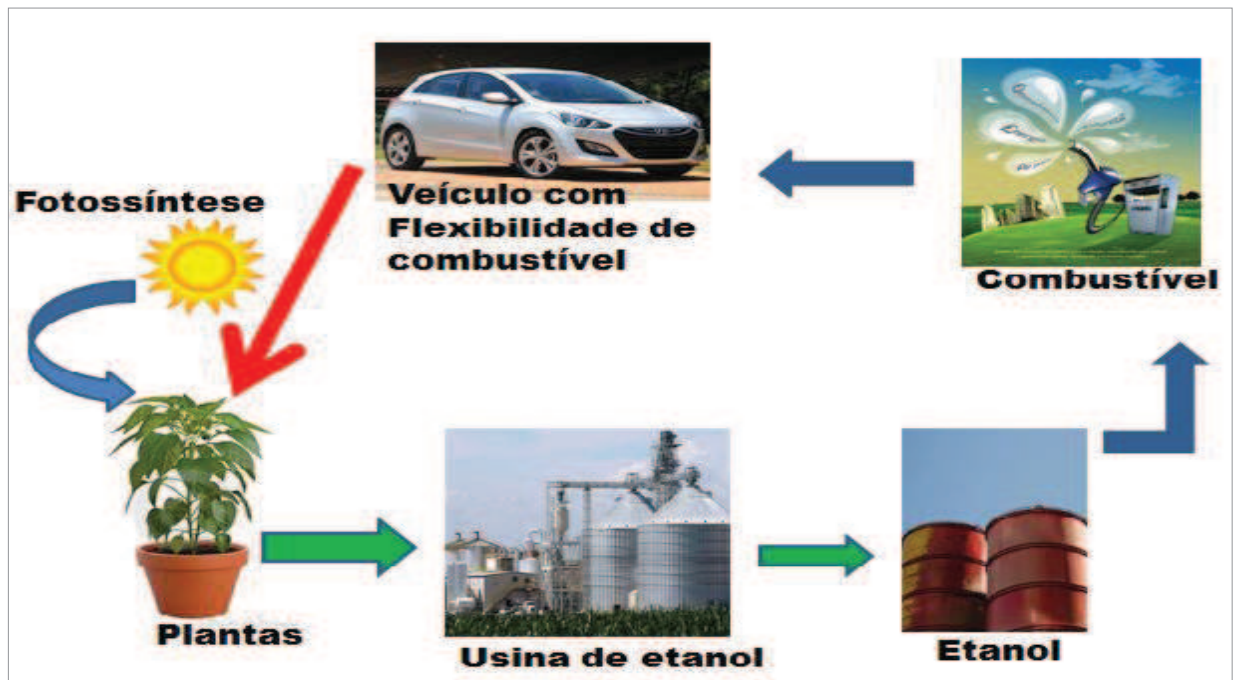
Apesar destas considerações, no cenário nacional mais atual, devido a fatores econômicos um impasse entre governo e empresas sucroalcooleiras, e também limitações agrônomicas relacionadas à produtividade e a incidência de pragas e doenças, levaram estas a optarem por uma maior produção de açúcar em relação ao etanol. A política de estabilização



da gasolina entra em choque com a necessidade do fechamento de um pacote de medidas visando incentivar a cadeia produtiva do etanol, afetando o patamar econômico entre a gasolina e o álcool. Apesar de ser pioneiro na produção e uso do etanol e de constituir-se como o único país com possibilidade de abastecimento de veículos com 100% de etanol, poucos foram os avanços que se concretizaram e a diminuição na produção deste combustível ou a sua redução a um simples aditivo da gasolina configurar-se-ia como um verdadeiro recuo (OBERLING, 2008; JANK, 2011).

Dessa forma, para que o Brasil se consolide neste segmento faz-se importante a realização de discussões que envolvam os impactos sociais decorrentes do aumento da produção de cana-de-açúcar, incluindo o trabalho escravo nas lavouras e o desenvolvimento local com sustentação da agricultura familiar e a segurança alimentar, devido ao fato do desvio na produção de grãos que tem a finalidade tanto para a produção de alimentos quanto para a produção de biocombustíveis. Assim, para que estes impactos sejam minimizados, é fundamental que o Governo, o setor privado, a sociedade civil organizada e a comunidade em geral façam a sua parte para que a retomada da produção em larga escala do etanol no Brasil se torne mais transparente, responsável e sustentável (ARAÚJO, 2008).

Cabe ressaltar também que a produção do etanol ocorre por meio de um ciclo parcialmente fechado desde a produção da matéria-prima, o plantio, a colheita, o transporte e o processamento da cana, até o produto final, pois durante o processo são consumidos combustíveis fósseis que geram emissões de GEE. Sendo assim, um balanço energético, visando à avaliação dos resultados líquidos no ciclo completo de produção do etanol de cana-de-açúcar e seu uso como combustível no setor de transporte faz-se necessário.



**Figura 7** - Representação esquemática do ciclo de produção de etanol (fonte: NEVC, National Ethanol Vehicle Coalition, 2007; adaptado por PEREIRA, 2014).

A queima deste biocombustível libera principalmente  $\text{CO}_{2(g)}$ , qual é reutilizado no processo de fotossíntese das plantas, minimizando o efeito estufa, tal processo contrabalança o que é liberado na queima dos combustíveis fósseis. Tem-se um balanço energético favorável, relacionado à emissão e absorção de  $\text{CO}_{2(g)}$ , produto da combustão, visto que para o crescimento e produção da biomassa ocorre a fixação deste gás como fonte de carbono na respiração, além de não conter na sua composição enxofre, do ponto de vista ambiental, a utilização deste biocombustível minimiza as alterações climáticas (SCHUCHARDT, 2001).

Por se tratar de um assunto que frequentemente acaba sendo mal compreendido, a emissão de aldeídos (R-CHO) merece uma apreciação à parte. A combustão do etanol gera a emissão de aldeídos, no entanto, este fato apesar de ser pouco difundido e conhecido, também é verdadeiro para os demais combustíveis automotivos como a gasolina pura, o óleo diesel e o gás natural. Os combustíveis fósseis geram uma variedade de aldeídos que apresentam elevada toxidez e alta reatividade fotoquímica na atmosfera, citando-se como exemplo o formaldeído, já na combustão do etanol gera-se especialmente o acetaldeído, um produto de toxidez mais baixa e, portanto de reduzido impacto ambiental (CENBIO, 2012).

Em decorrência dos avanços da tecnologia automotiva, tem-se reduzido demasiadamente a emissão destes compostos no decorrer dos anos. No que diz respeito aos veículos movidos a álcool, a média de emissão observada em 1992 (0,035 g/km) é inferior ao nível observado no fim da década de 1970 para os veículos movidos a gasolina pura (0,050

g/km). No ano de 2003, os veículos à álcool e gasolina C apresentaram, respectivamente, uma média de emissão de 0,020 g/km e 0,004 g/km. Já no ano de 2006, com o surgimento dos veículos *flex fuel*, a emissão média foi de 0,014 g/km, com o uso apenas do etanol, e de 0,003 g/km com a gasolina C. Valores estes que são substancialmente inferiores aos limites vigentes e futuros para a emissão de aldeídos. Em 2009, a emissão por veículos movidos a álcool foi 0,0104 g/Km e 0,0024 para gasolina C. Levantamentos executados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) demonstraram que o emprego do etanol em larga escala não tem efeito na presença de concentrações de aldeídos no ambiente que possam trazer riscos significativos à população (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008; CETESB, 2011).

Outros estudos realizados nos veículos diesel apontaram que estes apresentaram emissão de aldeídos que pode chegar a ser até 8 vezes superior a emissão de um veículo álcool, ou até 40 vezes superior a de um veículo movido a gasolina C (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

A emissão  $\text{CO}_{2(g)}$  pela combustão do etanol é inferior a sua emissão a partir da combustão dos combustíveis fósseis, considerando o ciclo de produção-uso do etanol (ARAÚJO, 2008). Segundo dados da CETESB, a emissão  $\text{CO}_{2(g)}$  pela combustão da gasolina A foi 2,269 Kg/L enquanto que o etanol hidratado emite 1,178 Kg/L (CETESB, 2011).

O etanol é empregado como combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha, sendo utilizado tanto por veículos flex quanto por aqueles movidos exclusivamente a álcool. De acordo com a Agência Nacional de Petróleo (ANP), pode ser utilizado em seu estado puro ou hidratado como biocombustível e também, conforme as normas de especificação podem ser adicionado à gasolina em uma porcentagem de 25% (MAPA, 2013).

Segundo dados literários, o etanol pode ser obtido a partir de várias matérias-primas agrícolas, desde que estas contenham em sua composição carboidratos fermentáveis, formados essencialmente de açúcares, pois o processo fermentativo ocorre pela presença destes. Entre as fontes de biomassa vegetal para a produção de etanol, destacam-se três grupos de matérias-primas: as açucaradas (melaço de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar, sorgo sacarino, etc), as celulósicas (sabugos, resíduos de madeira, palhas de amendoim, bagaços residuais) e as amiláceas (mandioca, batata, milho, sorgo sacarino), ricas em amido (PIMENTEL e PATZEK, 2005; FELTRAN, 2009). As fontes amiláceas (tabela 3) são alternativas viáveis para a obtenção de etanol. Tais substratos vêm sendo pesquisados buscando-se aperfeiçoamentos na conversão destes, de maneira mais rápida e com menores custos.

**Tabela 3** - Matérias-primas para a produção de bioetanol e seus comparativos de potencial de produção

Cultura	Produção de bioetanol (L/ton)
Cana-de-açúcar	70
Beterraba	110
Batata-doce	125
Mandioca	180
Milho	360
Arroz	430
Cevada	250
Trigo	240
Sorgo sacarino	60
Bagaço e outras biomassas de celulose	280

Fonte: BALAT; BALAT; ÖZ, 2008.

Apesar de inúmeros tipos de matérias-primas agrícolas existentes possibilitarem a obtenção do etanol, estas formas diferenciadas de produção a partir da cana-de-açúcar ainda não são muito difundidas no país. Contudo, discussões relacionadas a esta questão também merecem destaque, tendo em vista que além de algumas destas não se adaptarem a determinados climas e apresentarem baixo valor energético, fazem parte da cadeia alimentar humana, o que acaba gerando impasses no mercado dificultando seu emprego exclusivo para a produção do etanol combustível. Os biocombustíveis, obtidos da biomassa vegetal utilizados nos dias atuais, são provenientes de açúcar, amido ou oleaginosas que até pouco tempo eram destinadas exclusivamente de forma direta ou indireta à alimentação (CARDOSO e SOUZA, 2005; LEITE; LEAL, 2007; RIBEIRO et al., 2007; YAN et al., 2012).

Sob este aspecto, buscam-se alternativas as vias tradicionais para a produção de etanol provenientes da cana-de-açúcar e do milho. Com o avanço da biotecnologia, novas rotas vêm sendo pesquisadas a partir de materiais amiláceos e lignocelulósicos. O uso da biomassa lignocelulósica para a sua obtenção tem, ao contrário do processo de produção por fermentação e destilação, maior potencial para uma maximização da eficiência de conversão de luz solar, água e nutrientes em biocombustível (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008; YAN et al., 2012).

O processo denominado fotossíntese, é o meio pelo qual acontece a captura de energia solar e que se dá o armazenamento desta sob a forma de polímeros, citando-se a celulose, a hemicelulose, a pectina e a lignina. Esta energia armazenada pode ser liberada e utilizada por inúmeras formas, tanto na combustão direta quanto na sua bioconversão em compostos que possuam propriedades combustíveis. No processo de produção deste biocombustível lignocelulósico, envolve-se a coleta de biomassa, a despolimerização dos polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) em açúcares simples e fermentescíveis, a qual ocorre pelos processos de pré-tratamento e sacarificação, e finalmente a conversão de açúcares simples em biocombustível pela fermentação (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

A finalidade básica do processo de pré-tratamento consiste em promover a hidrólise da biomassa, de maneira que o aumento e/ou extensão desta interaja com o agente químico/físico empregado no processo, ocorrendo a dilatação da estrutura da parede celular, solubilização da hemicelulose e diminuição da cristalinidade da celulose, minimizando a formação de produtos de degradação, como furfurais e ácido acético, os quais podem intervir na atividade enzimática no decorrer dos processos de sacarificação e fermentação. A moagem simples da biomassa acompanhada por expansão de fibras a vapor, ou pelo tratamento da biomassa com amônia ou ácidos/bases diluídos ou concentrados são alguns dos métodos atuais mais empregados para a remoção da lignina e aumento do acesso de enzimas sacarificadoras à celulose (SILVA, 2010; DAMASCENO et al., 2010).

Estudos apontam que sua produtividade por hectare, por meio desta nova forma de obtenção que se encontra em fase de testes laboratoriais, poderia se tornar superior a atual. Segundo testes realizados pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de São Paulo, os níveis de sacarose podem chegar a um valor 15% maior quando comparados àqueles níveis encontrados na cana-de-açúcar comum. O CTC acredita que esta nova tecnologia possa ser empregada no mercado até o final da década, caso os testes de campo obtenham confirmação. Um dos benefícios do emprego desta nova tecnologia seria o fato de que a cana modificada geneticamente apresentaria um teor maior de sacarose, além de ser mais resistente as pragas e a seca, tornando-se mais rentável especialmente porque diminuiria o uso de defensivos agrícolas e demandaria menos irrigação. Contudo, juntamente com a nova tecnologia, novos grupos ambientalistas contrários a esta eventualmente terão que ser enfrentados, incluindo discussões decorrentes da utilização de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (FIGUEIREDO e FILHO, 2009).

Países que dispõem de alta tecnologia, como Alemanha, Dinamarca, Bélgica, Suécia, França e EUA, buscam por novas matérias-primas para a produção do etanol desde o final da década de 90. Nos EUA questionamentos a respeito da eficiência da produção de etanol a partir do milho não receberam ênfase, mesmo sendo sua agricultura subsidiada, optou-se por investimentos maciços em toda a cadeia, no campo da ciência e tecnologia, na sua produção propriamente dita, o que fez com que ultrapassasse o Brasil na produção deste biocombustível e se estabelecesse uma meta de aumento em seu consumo, que na safra 2011/12 foi de 58 bilhões de litros (YAN et al., 2012; NOVACANA, 2012).

Em decorrência ao aumento na demanda deste biocombustível, embora existam ainda dificuldades para sua obtenção, o Brasil, do ponto de vista tecnológico, acompanhado pelos

Estados Unidos e União Europeia, dentre outros, destaca-se na produção e na utilização do etanol como combustível (UNICA, 2012).

Diante do exposto, a continuidade no desenvolvimento de pesquisas visando o encontro de novas estratégias para a geração de etanol, a fim de se ampliar sua produção e efetivá-lo na matriz energética mundial é essencial. É visível a existência de um conflito implícito entre a produção de alimentos e a de biocombustíveis e, neste contexto, a *Cyperus esculentus*, erva daninha com eficiente sistema vegetativo de reprodução, considerada uma “praga” pelos agricultores, configura-se como uma importante fonte alternativa para a obtenção do etanol, podendo vir a somar na produção do etanol brasileiro, tendo em vista que não compete com a cadeia alimentar humana, apresenta ciclo anual, adaptações climáticas e aproveitamento do co-produto resultante na alimentação animal. Segundo dados literários esta planta possui aproximadamente 50% de amido em seus tubérculos, o que a caracteriza como detentora de um grande potencial para a obtenção deste bicombustível (OLADELE; AINA, 2007; MANEK et al., 2012).

Neste trabalho enfatizou-se a obtenção de etanol a partir da matéria-prima amilácea *Cyperus esculentus*, esta possui considerado teor de amido possibilitando a fermentação alcoólica. Apresenta diferenciais positivos, como a possibilidade de ser cultivada em diferentes regiões do país, não faz parte da cadeia alimentar e possui considerável potencial energético.



### 3.2.5.1 Considerações sobre a matéria-prima

#### 3.2.5.1.1 Tiririca (*Cyperus esculentus*)

Com origem na Índia, a tiririca (*Cyperus esculentus*), apresentada na figura 8, pertencente à família *cyperaceae*, é uma erva daninha conhecida popularmente como batatinha-de-junça, cebolinha, junca, junco, junquinho, tiririca amarela e tiriricão. É uma planta que apresenta características bastante singulares, como um eficiente sistema vegetativo de reprodução por rizomas, bulbos e tubérculos, com a produção de rizomas na base e tubérculos subterrâneos esferoides, desenvolvendo-se nos mais variados tipos de solo e possuindo conseqüentemente uma grande amplitude de distribuição geográfica. Foi relacionada pelo Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA)/Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar (PLANALSUCAR) em 1986 e citada como umas das espécies de maior frequência no agroecossistema da cana-de-açúcar, infestando especialmente os canaviais mais antigos (KUVA et al., 2000; MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

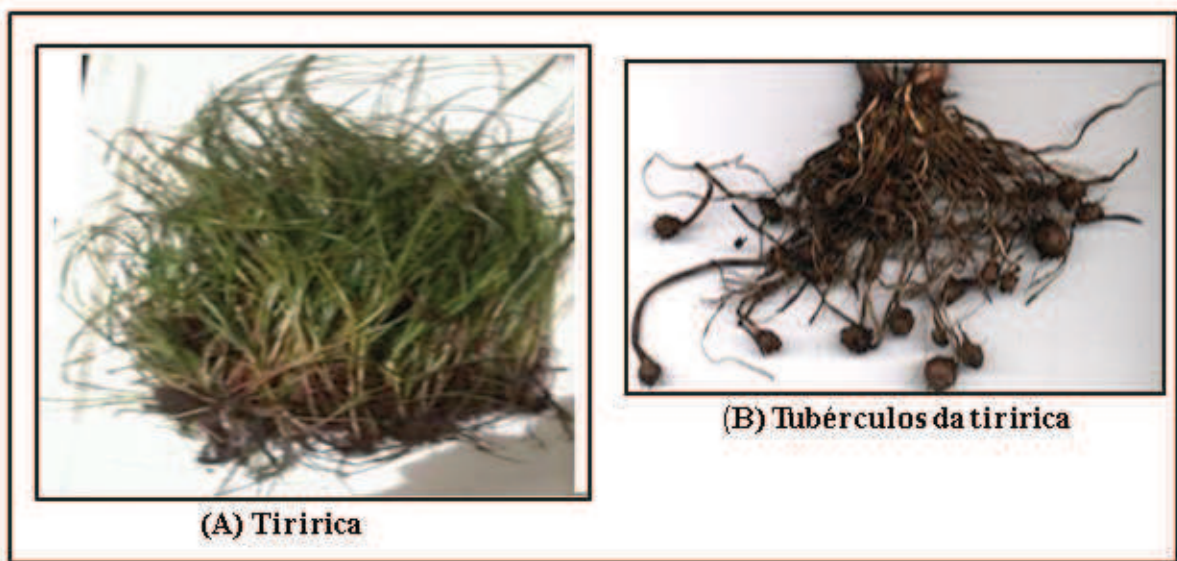


Figura 8 – *Cyperus esculentus*.

Sua presença é registrada em praticamente todos os países de clima tropical e subtropical, com registro também em regiões de clima temperado. Foi introduzida em nosso país pelos navios mercantes portugueses na era colonial e está presente em toda a extensão territorial brasileira. Por possuir grande capacidade de reprodução, pode gerar até cerca de quarenta toneladas de massa verde por hectare. Suas raízes possuem característica fibrosa e fina, chegando a 1 metro de profundidade e tolerando períodos de seca consideravelmente

prolongada. É uma planta perene, ereta e possui caule triangular, podendo atingir uma altura variável entre 20 e 90 cm, apresentando em sua extremidade tubérculos pequenos que podem se entrelaçar e formar correntes. A cultura da tiririca é de fácil propagação por ser tolerante à seca e possuir ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo (LORENZI, 2000; GALLINA, 2011).

Na figura 9, encontra-se a distribuição geográfica da *Cyperus esculentus*, onde se pode observar que sua predominância está em São Paulo e na região sul de Minas Gerais, bem como é encontrada também em outros Estados Brasileiros.



**Figura 9** - Distribuição geográfica da *Cyperus esculentus* (GALLINA, 2011).

Excluindo a necessidade de emprego de agrotóxicos para a sua cultura, a *Cyperus esculentus* colabora para a redução dos impactos ambientais consequentes do uso destes produtos, minimizando a poluição de solos e rios. Apresenta em sua composição hidratos de carbono, mono, di e polisacarídeos, com a presença de açúcares redutores, ricos em amido armazenado, além de possuir somente a finalidade mastigatória, não sendo empregada em usos industriais ou domésticos (KUVA et al., 2000; LORENZI, 2000).



Seu crescimento rápido dificulta seu controle e faz com que se torne grande competidora com outras culturas desenvolvidas no campo, interferindo e prejudicando em seu crescimento, o que acabou lhe dando a classificação de uma das piores ervas daninhas em todo o mundo. É uma planta invasora presente nas lavouras, hortas, pomares e jardins, afetando principalmente as culturas de cana-de-açúcar, feijão, algodão e milho. Todavia, seus tubérculos, devido aos compostos terpênicos, podem ser utilizados para fins terapêuticos, de modo que seu uso foi amplo na época da Idade da Pedra (GALLINA, 2011).

Por apresentar uma considerável capacidade de propagação a *Cyperus esculentus*, pode retirar do solo aproximadamente 815 Kg de sulfato de amônio, 320 Kg de cloreto de potássio e 200 Kg de superfosfato por hectare, para produzir 40 toneladas por hectare de matéria vegetal e 15 toneladas de rizomas (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

Pesquisas demonstraram que os tubérculos possui alto teor de amido, comparando-se ao amido proveniente da mandioca e do arroz, podendo apresentar um rendimento em peso seco de aproximadamente 20,51%. Destes, quase 90% são açúcares, o que viabiliza a fermentação, possibilitando a utilização em produtos a base de amido, cosméticos e endurecimento de tecido, tornando-se uma interessante alternativa para fins comerciais. Com relação à farinha da tiririca a variação de amido encontrada na literatura se encontra entre 27,5 e 50%. Em Xinjiang, o rendimento da cultura da *Cyperus esculentus* foi de 18 toneladas/ha em base úmida, com aproximadamente 30% de água, um valor elevado quando comparado ao milho, trigo e batata (MANEK et al., 2012).

A obtenção do etanol a partir da *Cyperus esculentus* consiste no processo de hidrólise e posterior fermentação de sua farinha por microorganismos responsáveis, quais transformam o carboidrato em etanol, apresentando algumas características fundamentais, como: elevada produtividade fermentativa; conversão do substrato em produto num curto espaço de tempo e em níveis elevados; apropriada tolerância ao produto formado; e resistência considerável a elevadas concentrações de substrato. A *Sacharomyces cerevisiae* é o tipo de levedura mais empregada nos procedimentos industriais (CARDOSO e SOUZA, 2005; MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

Por suas singularidades e por ser considerada uma “praga” pelos agricultores, sua utilização trará benefícios tanto à produção do álcool quanto aos demais cultivares. Entretanto, poucas são as bibliografias que demonstram o cultivo desta planta (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008).

Neste sentido, e considerando-se o aumento na demanda por etanol, visto que a produção deste biocombustível a partir da cana-de-açúcar se encontra no momento repleta,

com a cana sendo priorizada para a produção de açúcar pelas indústrias sucroalcooleiras, a busca por novas estratégias para a obtenção de álcool justifica-se. Este estudo desenvolveu-se empregando a *Cyperus esculentus* como matéria-prima viável para a ampliação da produção, podendo contribuir positivamente na matriz energética brasileira.

### 3.3 Amido

O amido é um polissacarídeo de origem vegetal que se acumula nas plantas na forma de grânulos insolúveis, constituindo-se num polissacarídeo de reserva de plantas, como milho, sorgo, arroz, feijão, trigo, tubérculos de batata-doce, mandioca e várias outras fontes, apresentando características variadas de acordo com a sua origem, tais como tamanho e formato dos grânulos, a proporção entre seus constituintes químicos, a absorção de água e temperatura de gelatinização, sendo considerada a principal fonte de armazenamento de energia dos vegetais (BRASIL, 1975; CEREDA; VILPOUX, 2003; VACLAVIK; CHRISTIAN, 2008).

Em seu estado nativo, grãos ou grânulos, o amido é insolúvel em água. Quando aquecido e sob agitação, este carboidrato passa a apresentar uma viscosidade. Seus grânulos possuem características particulares individuais conforme cada espécie, como sua composição química, estrutura molecular e comportamento físico-químico (FENNEMA, 2000). Sua proporção mais notória está exposta na tabela 4 (LAJOLO e MENEZES, 2006). O amido é considerado a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, compreendendo aproximadamente 90% de todos os polissacarídeos da dieta. Além disso, pode ser hidrolisado liberando glicose, maltose e oligossacarídeos menores, os quais podem ser utilizados para a obtenção de outros compostos químicos e servir de substrato para posteriores fermentações (DENARDIN, 2008).

**Tabela 4** - Representação da quantidade de amido

Partes da planta	Massa seca (%)
Grãos de cereais	40-90
Leguminosas	30-50
Tubérculos	65-85
Frutas verdes	40-70

Fonte: LAJOLO e MENEZES, 2006.

De acordo com a Legislação Brasileira, este polissacarídeo é conhecido como amido e fécula. Esta diferenciação surgiu devido à identificação do material na natureza, origem do produto e suas propriedades funcionais e tecnológicas, não estando relacionado com sua

composição química (BRASIL, 1978; VEIGA-SANTOS et al., 1994). A fécula é o produto extraído das partes subterrâneas, isto é, rizomas, tubérculos e raízes (SEBRAE BAHIA, 2009).

Os diferentes amidos não apresentam propriedades semelhantes, sendo utilizados na indústria com diversos propósitos, podendo ser: nutricional, tecnológico, funcional, sensorial e estético, entre outros.

Com a finalidade de se produzir etanol, o amido presente na farinha de tiritica, primeiramente será convertido em açúcares redutores passíveis de serem posteriormente fermentados por leveduras, obtendo-se como produto final o biocombustível.

### 3.3.1 Composição química do amido

Sua composição química esta diretamente relacionada às suas propriedades funcionais. O amido é constituído basicamente por dois compostos, a amilose e amilopectina, com a segunda configurando-se como sua principal constituinte, unidas por conformação espiraladas e apresentando-se em proporções variadas, dependendo da origem da espécie e o grau de maturação da planta. Estes dois polímeros, representados na figura 10 encontram-se distribuídos em regiões cristalinas e amorfas alternadas. A região cristalina ou micelar é formada principalmente por amilopectina, sendo resistente à entrada de água e ao ataque enzimático (VIEIRA, 2004; FRANCO et al., 2001).

Estes polímeros são quebrados em monossacarídeos e os açúcares totais são representados principalmente por sacarose, glicose e frutose (AEHLE, 2007; REGULY, 2000; SCIPIONI, 2011).

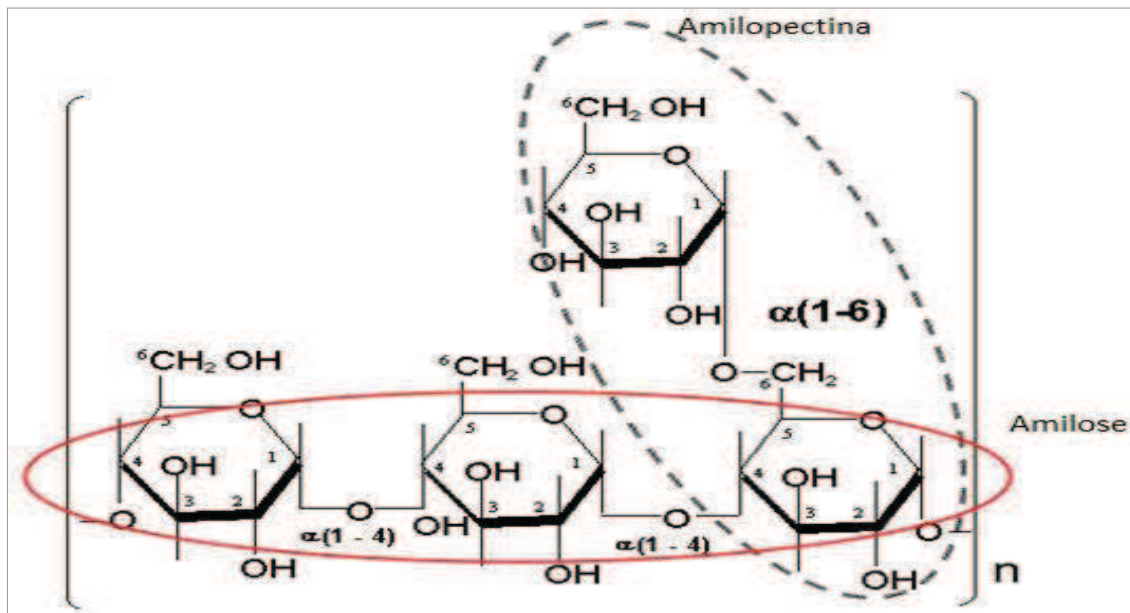


Figura 10 – Polissacarídeos constituintes do amido (BOBBIO, 2003).

As propriedades dependem do tamanho dos grânulos, teores de amilose e amilopectina e do tipo da cadeia destes compostos, incluindo-se também os demais constituintes como o fósforo e resíduos gerados na extração (CEREDA et al., 2001).

### 3.3.1.1 Amilose

A estrutura linear helicoidal da amilose é apresentada na figura 11, as moléculas de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, correspondendo a 20% da massa total do amido, solúveis em água (AEHLE, 2007; REGULY, 2000; SCIPIONI, 2011).

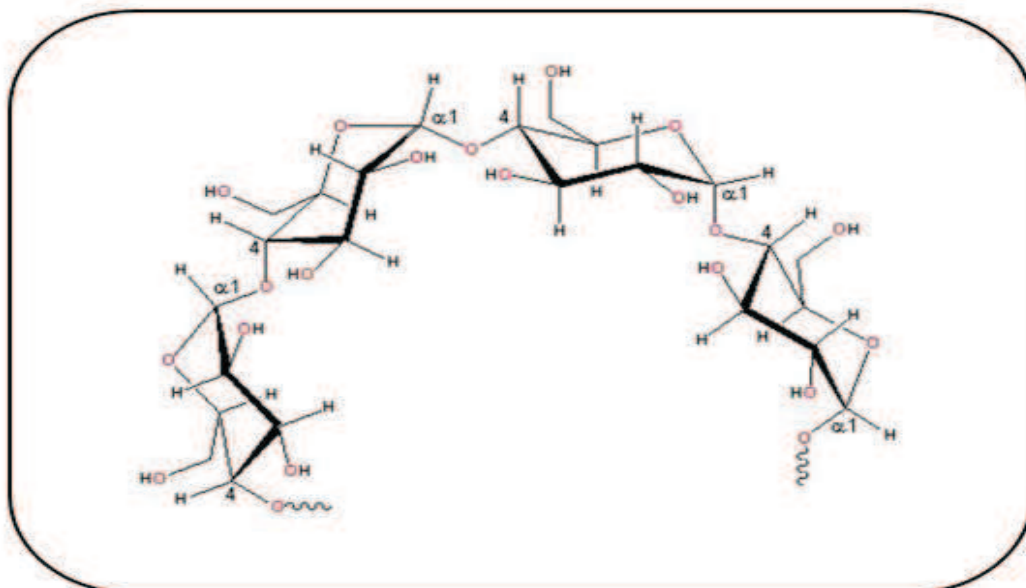
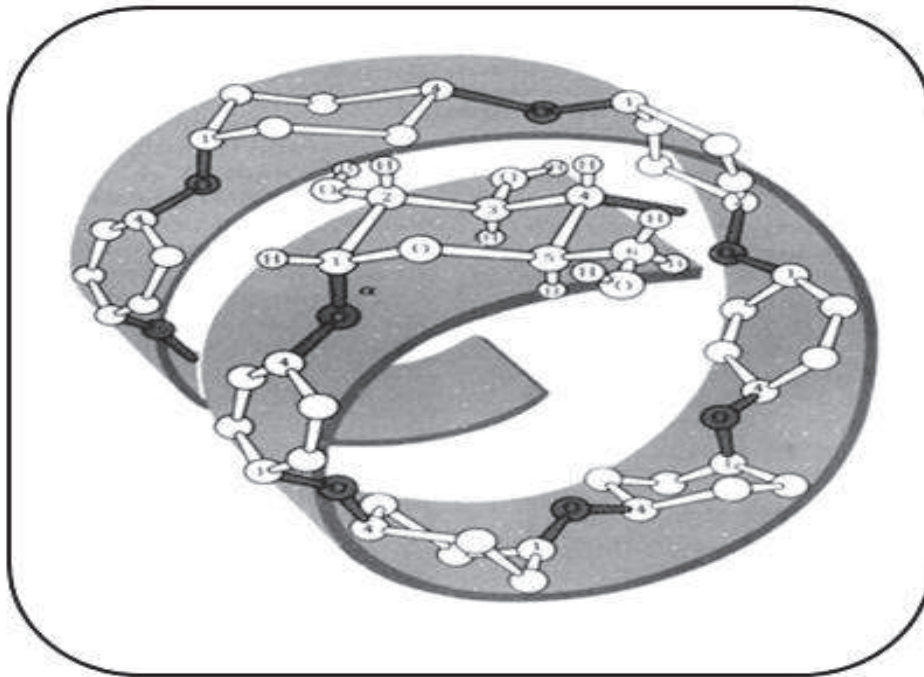


Figura 11 - Estrutura química da amilose (DENARDIN, 2008).

Embora a amilose seja considerada linear, verifica-se que não adquire inteiramente essa característica, estando presente uma pequena ramificação na sua estrutura. Alguns autores comentam que a presença dessas ramificações não influenciam no desempenho em solução das cadeias de amilose, de maneira que continuam igual ao comportamento das cadeias totalmente lineares (LACERDA, 2006).

Sua estrutura helicoidal, apresentada na figura 12, deve-se as unidades de glicose, que possui uma parte hidrofóbica em seu interior. Esta estrutura forma um complexo de coloração azulada na presença de iodo, devido a presença do complexo iodo-iodeto na parte inferior da hélice. Em cadeias menores, a coloração será vermelha, amarela ou marrom, devido a formação de outros complexos (compostos orgânicos, com álcoois alifáticos de cadeia ramificada) (LACERDA, 2006).

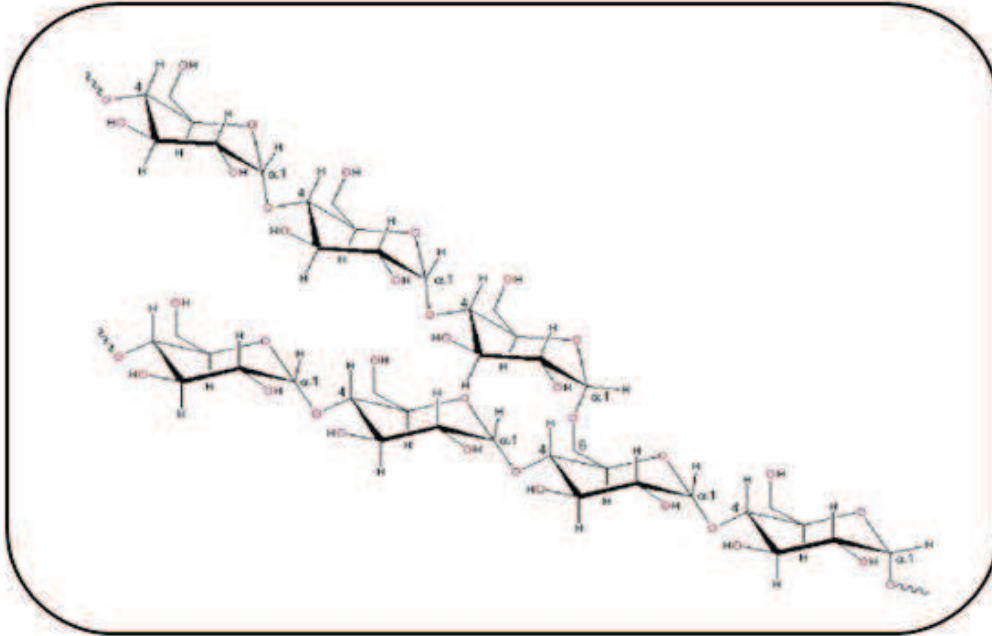


**Figura 12** - Representação da estrutura helicoidal da amilose (LACERDA, 2006).

### 3.3.1.2 Amilopectina

Ao contrário da amilose, a amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada, constituída por cadeias lineares mais curtas de ligações  $\alpha$ -1,4, contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, possuindo 15 a 45 unidades de glicose. É insolúvel em água, satisfazendo a 80% da composição do amido (VAN DER MAAREL et al., 2002; LACERDA, 2006; SCIPIONI, 2011).

Na figura 13, observa-se que a amilopectina é formada por uma cadeia principal com grupo reductor e várias cadeias ramificadas, devido às ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 (DENARDIN, 2008).



**Figura 13** – Estrutura química da amilopectina (DENARDIN, 2008).

Amidos com maior percentagem de amilopectina formam uma mistura espessa, porém não forma gel, pois as moléculas formadas por amilose-amilopectina se ligam quimicamente. Quanto maior for a proporção de amilopectina, mais viscosa será a pasta desse amido e quanto maior a quantidade de amilose, mais gelatinoso (LACERDA, 2006).

### 3.3.1.3 Outros constituintes do amido

A composição de amilose e amilopectina em massa seca no amido é de aproximadamente 99 %, o restante do percentual apresenta compostos nitrogenados, lipídios e minerais (fósforo). Embora estes constituintes estejam presentes em quantidades pequenas, podem influenciar nas propriedades do amido (CEREDA, 1996).

O amido proveniente dos cereais contém 0,6 % de lipídeos. Esta é considerada uma das frações mais relevantes associadas pelo fato de complexar com a amilose, alterando as propriedades funcionais do amido. O complexo formado reduz a solubilidade do amido em água, diminuindo sua capacidade de inchaço e impedindo assim sua hidratação, reduzindo a rigidez do gel, acarretando num aumento da temperatura de gelatinização e diminuindo a aplicação da hidrólise enzimática. As proteínas e as variadas substâncias inorgânicas formam

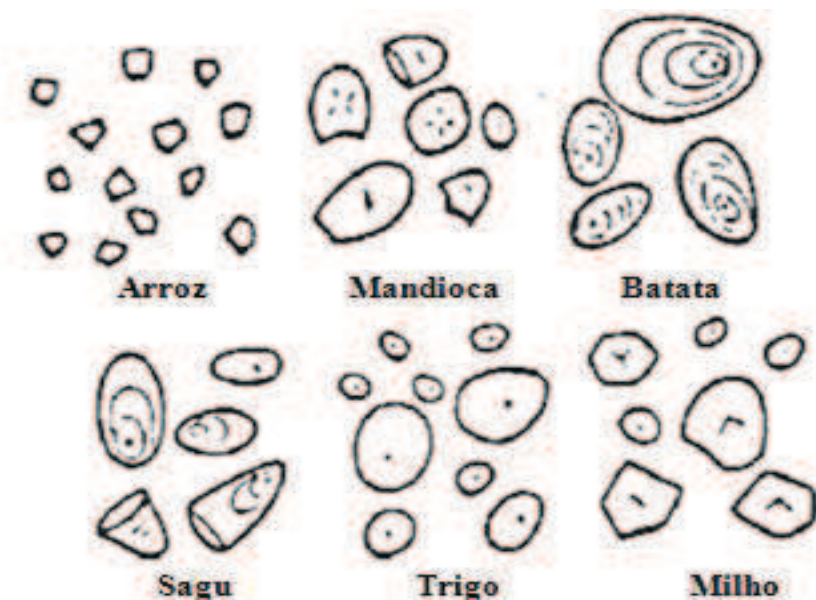


os demais componentes, sendo consideradas impurezas por não formarem ligações covalentes com os polissacarídeos constituintes do grânulo (PERONI, 2003).

### 3.3.2 Estrutura granular

O amido é o único carboidrato naturalmente encontrado na forma de grânulos. Segundo Biliaderis (1991), a cristalinidade do amido conserva a estrutura do grânulo, controlando seu comportamento em meio aquoso e a resistência aos ataques químicos e enzimáticos. A região menos densa dos grânulos, denominada fase amorfa ou gel, é mais suscetível ao ataque enzimático, absorvendo mais água em temperaturas inferiores a temperatura de gelatinização (CEREDA, 2001).

Os grânulos podem ser subdivididos em amido de cereal e amidos derivados de raízes e tubérculos, de modo que quando armazenados desta forma são insolúveis. A figura 14 apresenta os grânulos provenientes de diferentes fontes botânicas variando sua composição, forma e tamanho (HOOVER, 2001). Os grânulos oriundos dos cereais são em geral menores, contendo maior quantidade de resíduos de proteína e lipídeos quando comparado com os amidos de raízes e tubérculos (CEREDA, 2001).



**Figura 14** - Grânulos de amido de diferentes fontes botânicas (CEREDA, 2001).

A camada cristalina no formato de micelas é proveniente de duas estruturas da amilopectina no formato de hélices empacotadas em sentido paralelas, apresentando na cadeia regiões desorganizadas, nas quais prevalece a ramificação amorfa. De acordo com OATES (1997), a molécula de amilose adquire uma porção independente no grânulo do amido,

estando entre as moléculas de amilopectina em quantidades significativas nas regiões amorfas atreladas a ligações de hidrogênio.

### 3.3.3 Gelatinização

A matéria-prima, após redução do seu tamanho, para efeitos de liquefação e sacarificação, deve ter os grânulos expostos à umidade e aquecimento para que se chegue à temperatura de gelatinização, própria de cada espécie. Esta hidratação das macromoléculas é essencial, pois torna o amido mais susceptível à ação dos ácidos e mais acessíveis às enzimas, beneficiando a interação substrato-catalisador. Neste meio, ocorre maior vibração nas moléculas de amilose e amilopectina, acarretando na quebra das ligações de hidrogênio entre as cadeias destes polímeros (SINGH et al., 2003).

A gelatinização é o processo em que se dá o rompimento da regularidade molecular no interior do grânulo, com a ruptura das ligações de hidrogênio mais fracas, que unem as cadeias de amilose e amilopectina, resultando em absorção de água e conseqüente intumescimento ou inchaço dos grânulos, fusão dos cristalitos e desenvolvimento de viscosidade, solubilizando os componentes, em especial a amilose, tornando os grânulos mais susceptíveis a ação enzimática posterior (SINGH et al., 2003; BENINCA, 2008; CEREDA; VILPOUX, 2003).

As condições de temperaturas variam de acordo com a matéria-prima, ficando este valor geralmente entre 80 °C e 150 °C, num espaço de tempo que pode chegar a 90 minutos. Partindo-se do fato de que cada espécie vegetal de amido possui morfologia e propriedades físico-químicas próprias. A umidade do amido pode chegar até no máximo 30% nas regiões amorfas do grânulo sem comprometer as micelas (denominadas zonas cristalinas) (EDUARDO, 2002).

Após resfriamento das soluções de amido, ocorrem as interações moleculares especialmente nas ligações de hidrogênio entre as cadeias de amido, formando géis ou precipitados micro cristalinos. A formação destes está atrelada a concentração da espécie e a velocidade de resfriamento, portanto, quanto mais concentrada a solução e mais rápido for o resfriamento maior a tendência à formação de géis, em contrapartida, as soluções diluídas após repouso para resfriamento tendem a formação de precipitados (HOOVER, 2001).

Ocorrendo o processo de retrogradação as moléculas de amido interagem novamente em uma estrutura ordenada. Estas moléculas organizam-se na estrutura de dupla hélice disposta pela fração linear diminuindo a solubilidade e desenvolvendo uma forma cristalina.



Por outro lado, a amilopectina fração ramificada possui dificuldade para este rearranjo cristalino, de modo que estas ramificações atrapalham a aproximação das cadeias poliméricas, fazendo com que a amilopectina permaneça em solução (HOOVER, 2001).

### 3.3.3.1 Hidrólise do material amiláceo

Todas as matérias-primas amiláceas precisam ser hidrolisadas para posterior fermentação. Primeiramente, estas fontes amiláceas demandam da reação do amido com a água (hidrólise), para a fragmentação deste em açúcares fermentáveis (sacarificação), ocorrendo à modificação da cristalinidade da macromolécula do amido. O processo de hidrólise rompe o polímero de amido em pequenas cadeias, como dextrina, maltose, açúcares simples ou monômeros de glicose, etapa essencial para o uso do amido. Este procedimento é realizado em duas etapas, sendo a primeira denominada liquefação e a segunda sacarificação (GOULD, 1975; FERREIRA et al., 2005; LEONEL e CEREDA, 2002; MENEZES, 1980).

Na etapa de hidrólise, o polissacarídeo é convertido em glicose, que pode ser catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas. Tanto a hidrólise ácida quanto a enzimática possui a finalidade de reduzir o amido em monossacarídeos.

De modo geral, a hidrólise decorre do inchaço do amido e sua solvatação, catalisada por agentes químicos ou biológicos, quais auxiliam o percurso da reação, o amido é misturado com água, agitado e submetido a aquecimento visando à ruptura dos grânulos. Posteriormente, enzimas ou ácidos inorgânicos são adicionados para quebrar as ligações. O desmembramento das moléculas de amilose e amilopectina formam dextrinas cada vez mais simples e, por fim, glicose (FRANCO et al., 2001; NIBA, 2005).

A rota ácida possui como vantagem o tempo de conversão mais curto, contudo tem como desvantagens a necessidade de neutralização no final do processo a fim de não inibir a fermentação posterior, a corrosão de equipamentos e a geração de açúcares não fermentáveis (CEREDA, 2001).

A quebra do amido via rota enzimática demanda de condições específicas, além de ser mais onerosa. No entanto, a ação das enzimas apresenta alta especificidade, permitindo a obtenção de produtos com propriedades físico-químicas bem estabelecidas e fazendo com que o procedimento ocorra em reações mais brandas (EDUARDO, 2002). Por estas características, industrialmente, de modo especial na indústria Norte Americana e na Europa, o uso da hidrólise via rota enzimática está bem disseminado pelo fato do produto obtido ser mais seletivo, como a glicose ou xarope concentrado de maltose. Já no Brasil, este

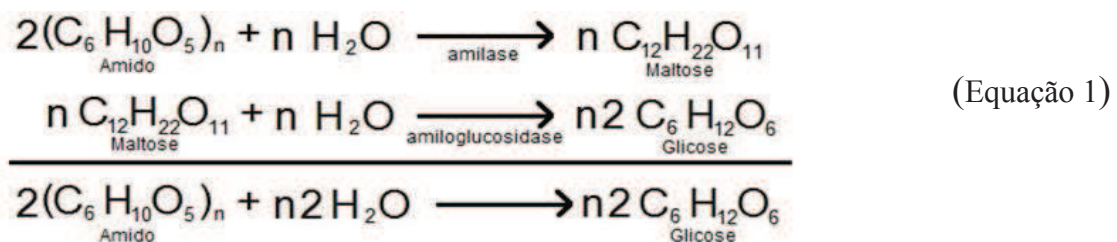
procedimento ainda não é muito disseminado (BRAMBILLA, 2001; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; PASSOS, 2002).

### 3.3.3.1.1. Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática o processo biológico ocorre por meio da ação de enzimas, as quais podem ser concentradas, purificadas ou industriais, da mesma forma que a hidrólise ácida, a finalidade é reduzir o amido em monossacarídeos. As enzimas empregadas neste processo são a  $\alpha$  ou  $\beta$ -amilase e a amiloglucosidase, de modo que suas respectivas ações sobre a macromolécula do amido resultam em moléculas de maltose, dextrinas e glicose. A atração entre estas moléculas promove a quebra do amido liberando glicose, o que é possível devido à cooperação entre as enzimas (CARVALHO, 2008).

Dentre os constituintes do processo de hidrólise, a forma mais favorável para que o açúcar seja fermentado é a glicose. A maltose e a dextrina, por possuírem em função da cadeia carbônica maior impedimento histórico, são menos assimiláveis pelas leveduras (AMARAL, 2007; SCIPIONI, 2011).

Tendo em vista que o amido é uma substância estável, sua reação de decomposição consiste num processo lento. Sendo assim, esta ocorre na presença de catalisadores quais favorecem a quebra das ligações glicosídicas, favorecendo a liberação de açúcares. A equação 1 representa genericamente a reação de decomposição do amido via rota enzimática (CEREDA, 1986).



A capacidade da enzima em diminuir o consumo energético no processo reacional é o princípio básico da catálise enzimática, esta diminuição termodinamicamente favorável, passará a ser também cineticamente favorável.

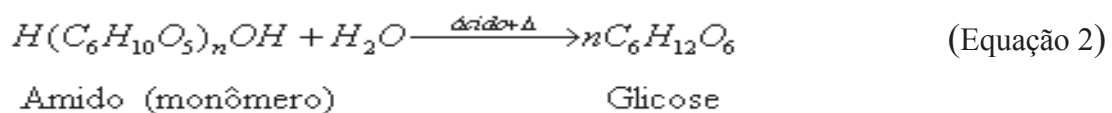
Sob o aspecto de rendimento, a hidrólise enzimática possibilita em longo prazo uma redução nos custos, com rendimento satisfatório, condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além de ser menos poluente. Porém, atualmente, pelo alto

valor das enzimas empregadas no processo, bem como pelas altas temperaturas necessárias nas reações empregadas e o maior custo para o processamento de matérias-primas amiláceas, sua viabilidade econômica é ainda elevada (CABELLO, 2007). Consequentemente, quando comparado ao etanol proveniente da cana-de-açúcar, o etanol produzido a partir de amiláceas torna-se menos competitivo. Assim sendo, a realização de estudos visando a obtenção de enzimas com uma maior eficiência e a adoção de cultivares com alto teor de matéria seca e elevada produtividade de raízes, possibilita o alcance de melhores resultados econômicos (SILVEIRA, 2008).

Dentre as vantagens do processo de hidrólise enzimática citam-se a maior seletividade da reação, diminuindo deste modo a formação de subprodutos como ácidos orgânicos e glicerol, gerados no processo de hidrólise ácida, e a especificidade das enzimas faz com que os produtos obtidos apresentem propriedades físicas e químicas melhores definidas. Também, diferentemente da hidrólise ácida, não se tem a preocupação com problemas de corrosão de equipamentos e necessidade de neutralização (SURMELY et al., 2003).

#### 3.3.3.1.2 Hidrolise ácida

A equação 2 representa a hidrólise ácida empregada para a modificação do amido possui algumas vantagens, como o custo e o rompimento em menor tempo da macromolécula do amido. O processo se dá por meio da utilização de uma quantidade de ácido, até que se atinja um pH de 1,0, elevando-se então a temperatura em torno de 131 a 150 °C, por um período de tempo de 5 a 8 minutos. Posteriormente, realiza-se a neutralização do respectivo ácido e então a mistura resultante é filtrada, descolorida e concentrada. No processo final da hidrólise obtêm-se glicoses livres, dextrose, dextrinas e maltodextrinas, com uma forte tendência à retrogradação, resultando-se em soluções turvas (BLANCHARD; KATZ, 1995; KEARSLEY; DZIEDZIC, 1995; MOREHOUSE; MALZAKS; DAY, 1972).



O ácido submetido às temperaturas supracitadas hidrolisa tanto as ligações  $\alpha$ -1,4 quanto as  $\alpha$ -1,6, sobrevivendo à clivagem nas cadeias da amilose e da amilopectina diminuindo assim os seus tamanhos e transformado-as em açúcares redutores. Conforme o tipo de ácido empregado no processo, a coloração da solução e a formação dos produtos são variadas, de

modo que a origem do amido e o processo a ser utilizado apresenta significativa influência na composição e propriedades do produto obtido ao final (KEARSLEY; DZIEDZIC, 1995).

### 3.4 Enzimas

As enzimas classificam-se em grupos conforme o tipo de reação catalisada, recebendo assim um código de identificação para a classificação. A classe das hidrolases pertence às amilases de maior interesse industrial. São ferramentas na natureza para a construção/destruição de moléculas necessárias à vida. Em cerca de 100% dos processos biológicos, há a necessidade da ação de uma determinada enzima em algum momento, capazes de catalisar reações extremamente complexas e específicas em condições fisiológicas. Por possuírem propriedades de alta especificidade e seletividade química, podendo ser empregadas como catalisadores em diversas reações químicas, apresentam grande importância em processos biotecnológicos, configurando-se como as moléculas biológicas intensamente estudadas (REGULY, 2000).

As enzimas são biocatalisadores, substâncias orgânicas distintas constituídas por polímeros de aminoácidos. Aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem dentro das células vivas, reduzindo a barreira energética destas, sem sofrer qualquer alteração durante o processo. São fundamentais em fermentações industriais por este procedimento depender da ação enzimática de microorganismos. Além disso, possibilitam às indústrias o uso de processos mais econômicos diminuindo o consumo de energia, sendo mais confiáveis e menos poluentes comparativamente ao uso de ácidos. Deste modo, podem substituir produtos químicos poluentes e, devido as suas particularidades evitam resultados indesejáveis (LEADLAY, 1993; ROSAS, 2003).

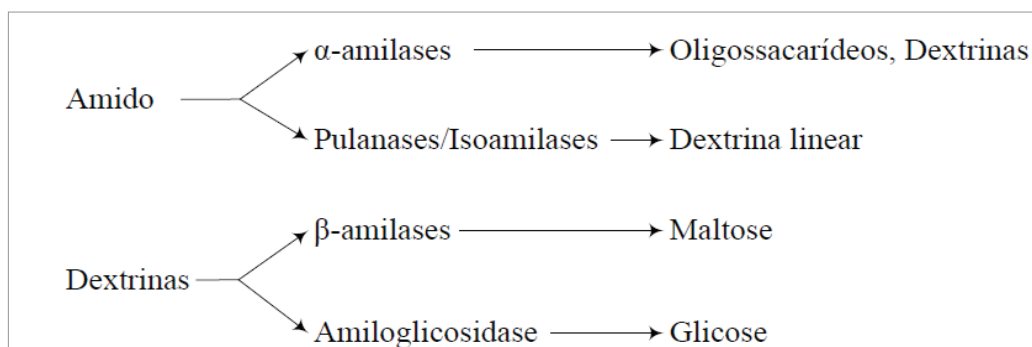
Alguns fatores externos influenciam na atividade enzimática como a temperatura e o pH. Quanto mais elevada à temperatura, mais rápida a reação acontecerá até atingir a temperatura ótima, para então a atividade diminuir decorrente da desnaturação da molécula. O pH também possui um valor favorável, onde a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima, especialmente no sítio catalítico, é ideal para a catálise (REGULY, 2000).

### 3.4.1 Enzimas amilolíticas

As amilases são enzimas que agem diretamente na degradação do amido, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), são divididas em endo e exoenzimas. Hidrolisam as moléculas de amido degradando-o em oligossacarídeos e dextrinas diferentes, em dissacarídeos como a maltose e em monossacarídeos como a glicose. Essas maltodextrinas, ligeiramente doces, são submetidas a mais uma conversão por meio da adição de outras enzimas promotoras do desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina, que ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose (REGULY, 2000).

A  $\alpha$ -amilase caracteriza-se como uma endoenzima, agindo em qualquer lugar nos grânulos de amido, degradando a cadeia e rompendo as ligações no interior do substrato, produzindo dextrina, maltose e glicose. Já as exoenzimas como a  $\beta$ -amilase atuam nas extremidades não redutoras finais, hidrolisando o amido em duas unidades de glicose. As glucoamilases (amiloglicosidases), também exoenzimas, hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 formando glicose e, vagarosamente ligações  $\alpha$ -1,6, liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975).

Na figura 15, a etapa de liquefação ou dextrinização é demonstrada pela ação da  $\alpha$ -amilase, promovendo como características físicas a redução da viscosidade e como químicas a formação de dextrinas. Esta transformação do amido em dextrina provoca uma redução da viscosidade do amido gelatinizado (COSTA, 2010).



**Figura 15** - Hidrólise enzimática do amido (COSTA, 2010).

Estas enzimas são indispensáveis nos procedimentos industriais, apresentando grande relevância biotecnológica nos mais diversos setores, incluindo têxtil, panificação, liquefação e sacarificação do amido, dentre outros (PANDEY et al., 2005).

#### 3.4.1.1 Alfa-amilase

Como já citado, a  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glicano glicanoidrolase, EC 3.2.1.1) apresenta atividade endohidrolítica, hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em cadeias mais curtas, internas das moléculas de amido. O ataque ocorre de uma maneira não seletiva sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, causando sua solubilização e redução de viscosidade, formando dextrinas, açúcares redutores e oligossacarídeos de cinco a sete unidades de glicose (configuração  $\alpha$  no carbono C<sub>1</sub> na unidade de glucose redutora produzida). Este ataque se dá em duas etapas, a primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, ocorre lentamente, formando glicose e maltose (AEHLE, 2007; SPIER, 2005).

As ligações  $\alpha$ -1,6 não são quebradas pela ação desta enzima. A faixa de pH ótimo para a ação da enzima situa-se entre 5,0 e 6,0 e a temperatura entre 55 °C e 70 °C (SPIER, 2005). A sacarificação da amilopectina pela  $\alpha$ -amilase forma como produtos finais glicose, maltose e dextrinas limite, oligossacarídeos contendo quatro ou mais unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (AQUARONE et al., 2001).

#### 3.4.1.2 Amiloglucosidase

Amiloglucosidase ou glucoamilase é uma exoenzima que atua nos mesmos substratos que as endoamiloses, porém de maneira diferenciada, atuando nas ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, possibilitando a liberação de unidades de glicose a partir de extremidades não redutoras do amido, dextrina, além da maltose, hidrolisando-as a D-glicose. Juntamente com a  $\alpha$ -amilase, desempenha um papel fundamental na hidrólise do amido apresentando um efeito sinérgico (efeito ativo e retroativo do trabalho), propiciando uma hidrólise mais efetiva. A amilose pode impedir a digestão no grânulo do amido pela amiloglucosidase, visto que na presença concomitante da  $\alpha$ -amilase, a hidrólise é mais eficaz (SURMEY, 2003).

A faixa de pH ideal para uma ótima atividade é 5,0, com maior estabilidade na faixa de 4,0 – 5,0. Industrialmente, é utilizada na produção de xarope de glicose (POLAKOVI, BRIJAK, 2003).

### 3.5. Fermentação

O processo de fermentação define-se por uma transformação bioquímica provocada num substrato, por meio de um fermento vivo ou por um princípio extraído deste. Também pode ser entendida como um processo metabólico anaeróbico de produção de energia, em que os microorganismos oxidam parcialmente o substrato, agindo sobre uma ou mais de suas partes, originando produtos modificados de forma a obter características desejáveis. A integração extremamente coordenada destas reações determinam as vias metabólicas de uso do substrato pelos microorganismos. Diversos setores da agroindústria, destacando-se o da alcooleira, estão diretamente relacionados à importância deste processo. Para este setor, a espécie predominante para emprego nos processos de fermentação é a *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983; LIMA, BASSO & AMORIM, 2001; BELLUCO, 2001).

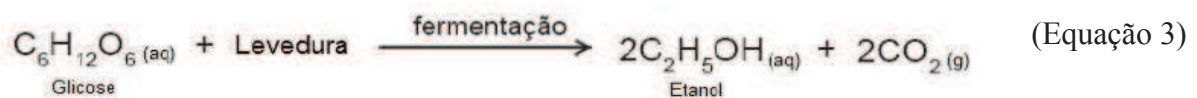
O uso da fermentação alcoólica se dá desde a antiguidade, há cerca de 4.000 anos os povos egípcios já fabricavam o pão e produziam suas bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. O conhecimento a respeito da produção de bebidas alcoólicas por meio da fermentação de grãos e cereais também já se dava do ano 6.000 A.C., mas apenas recentemente é que se pôde relacionar o processo de fermentação com as leveduras (VILLEN, 2009; BELLUCO, 2001; LIMA et al., 2001).

A ação das leveduras que utilizam os açúcares do mosto para seu desenvolvimento e multiplicação é que dá início a fermentação alcoólica, resultando na produção de álcool. A levedura cresce e multiplica-se enquanto houver a presença de oxigênio no mosto, de modo que, quando este elemento se esgota, tem-se o início da produção de álcool e dióxido de carbono.

No que se refere à evolução dos estudos relacionados ao mecanismo da fermentação alcoólica, Back foi o primeiro a afirmar, no século XVIII, que excepcionalmente eram capazes de sofrer este processo os líquidos açucarados. Postulou que o álcool etílico e o gás carbônico eram os únicos produtos obtidos do processo de fermentação alcoólica (MENEZES, 1980). Porém, o primeiro a realizar um estudo quantitativo deste processo em 1789, foi Lavoisier. Posteriormente a formulação da estequiometria da fermentação por Gay-Lussac, em 1815, Pasteur, em 1863, explica de forma clara o mecanismo, demonstrando a sua origem microbiológica, através de um processo anaeróbio, atribuindo assim sua causa a seres vivos, ou seja, as leveduras. Desde então estudos contribuíram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela modificação química do açúcar em

etanol e gás carbônico no interior (citoplasma) destes microorganismos (LIMA et al., 2001).

A geração de energia pela ação dos agentes fermentativos se dá devido à necessidade desta para o seu desenvolvimento e sobrevivência. O carbono necessário ao desenvolvimento das leveduras deve estar na forma de mono ou dissacarídeos. Em decorrência do consumo do carbono para a produção de ATP, a molécula de glicose é transformada em álcool, com o desprendimento de  $\text{CO}_2(\text{g})$  (BAI, et al., 2008). Desta maneira, os açúcares liberados por meio dos processos de hidrólise são então fermentados, através da ação de leveduras, visando a produção do álcool. A equação 3, representa a reação envolvida neste processo de fermentação para a produção de álcool (SOLOMONS, 1999).



Juntamente a formação do etanol, tem-se a obtenção de compostos secundários incluindo o glicerol, ácido succínico e álcoois superiores, o que pode interferir na eficiência fermentativa, com alterações na estequiometria do processo. A presença de álcoois superiores no meio fermentativo torna-se indesejável nas destilarias devido à dificuldade para a obtenção do etanol puro. Todavia, para as bebidas alcoólicas, estes álcoois possuem importante função no aroma destas (VANDENBERGHE, 2003).

### 3.5.1. Fatores que afetam a fermentação

Inúmeros são os fatores que podem interferir no processo de fermentação alcoólica, tais como, físicos (pressão osmótica, temperatura), químicos (oxigenação, pH, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (linhagem e concentração da levedura, espécie e contaminação por bactérias) (LIMA et al., 2001; BASSO, 2004). Para a temperatura, recomenda-se o intervalo entre 25 e 36°C, pois abaixo deste tem-se o retardo do processo fermentativo e acima a evaporação do etanol e o favorecimento de possíveis contaminações, além disso, a própria levedura torna-se mais sensível à toxidez do etanol. No caso do pH, os valores ideais encontram-se entre 4,0 e 5,1 (MENEZES, 1980).



### 3.6 Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Configurando-se como os microorganismos de maior importância no processo de obtenção do álcool por meio da fermentação, as leveduras são fungos que se apresentam vastamente disseminados no ambiente e que possuem capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Pertencem ao grupo dos ascomicetos, fungos com características superiores, unicelulares, eucarióticos e heterotróficos, de um modo geral, se apresentam maiores que as bactérias e possuem basicamente formas arredondadas, ovais ou elípticas. Com relação às suas dimensões, podem variar consideravelmente, desde 1 a 5 µm de largura e 5 a 12 µm de comprimento, conforme espécie, nutrição e idade, entre outros fatores (ANDRIETA & STECKELBERG, 2006).

Podem se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura, com um intervalo ótimo para o seu crescimento situando-se entre 26 e 35°C, sendo a média de 30°C. Para a variação de pH, os limites ótimos estão entre 4,5 e 6,5. Por não possuírem flagelo, são imóveis, suas formas de reprodução são brotamento ou gemulação, e sua composição é de cerca de 70 a 83% de água e o restante de compostos nitrogenados, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, entre outros. O carbono orgânico é fundamental para seu crescimento e obtenção de energia, de modo que os carboidratos são os nutrientes de maior importância (ANDRIETA & STECKELBERG, 2006).

A espécie mais importante para o setor sucroalcooleiro, como já citado anteriormente, é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas e etanol. O alto rendimento e a elevada produtividade, isto é, a rápida conversão do açúcar em álcool com pouca produção de componentes secundários constitui-se nos critérios tecnológicos que fazem com que esta levedura seja empregada comercialmente no processo de fermentação alcoólica. Por não se tratar de microorganismo patogênico, é uma espécie atrativa de se trabalhar (PATARO et al., 1998; OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Geralmente possuem resistência a altas temperaturas, contudo, quando associada à presença de etanol ou baixo pH, este fator interfere na viabilidade celular (SILVA-FILHO et al., 2005).

Durante o processo fermentativo, as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais que interferem diretamente em seu crescimento e multiplicação, influenciando conseqüentemente a eficiência do processo. As leveduras variam em sua composição em decorrência de diversos fatores, podendo-se citar o substrato no qual é cultivada, a sua espécie, o método de fermentação, o modo e as condições de secagem empregadas e também

a idade das células. Entretanto, o nitrogênio, juntamente com o carbono, hidrogênio e oxigênio são os principais elementos presentes nas leveduras, constituindo cerca de 94% da matéria seca (RUSSELL, 2003; BELLUCO, 2001; BAI et al., 2008).

Por ser um dos principais elementos presentes, entrando como constituinte de muitas substâncias encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, as proteínas, os pigmentos respiratórios (citocromos) e as vitaminas, o nitrogênio é considerado um elemento de extrema importância, sendo essencial para a multiplicação e crescimento destas. Destaca-se também a importância da adição deste elemento extracelular para uma contínua produção de novas células. A forma como se apresenta no meio é fundamental para o seu aproveitamento, sendo a mais favorável a amoniacal (BELLUCO, 2001; BAI et al., 2008).

Cabe ressaltar que a processo de fermentação alcoólica pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio, desde que a concentração de glicose ultrapasse um valor crítico, que irá depender do microorganismo, devido à inibição da síntese de enzimas respiratórias. Desta maneira, nestas condições o piruvato é reduzido a etanol, com liberação de dióxido de carbono (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

### 3.7 Planejamento experimental

O planejamento experimental incide em uma série de técnicas empregadas para descobrir as condições de funcionamento de um processo, buscando-se otimizar a capacidade de produção e custos baixos do processo e produtos (HUBBARD, 2003). Num planejamento  $2^k$  ou em qualquer planejamento fatorial, na prática é apropriado não trabalhar com medidas numéricas atuais das variáveis, mas sim é preferível trabalhar com variáveis codificadas, ou seja, codificando-se os níveis dos fatores (ESPINOSA, 2001).

O emprego de métodos estatísticos visa à otimização de dados experimentais, de modo que vem sendo utilizado como ferramenta de auxílio em pesquisas, pois fornecem números de ensaios reduzidos e mais exatidão nas informações obtidas (COSTA, 2010). Tais planejamentos são essenciais para analisar as influências de uma ou mais variáveis, sujeitas a todas as combinações das demais, na resposta de um processo.

A metodologia de superfície de resposta (MSR), por ser uma técnica de otimização estatística de experimentos baseada em planejamentos fatoriais, implica na representação de superfícies em três dimensões, demonstrando de maneira simplificada a tendência na variável de resposta que deverá ser analisada posteriormente (ALVES, 2012).

### 3.8 Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria é uma medida de absorção ou transmissão de luz, por meio dela é possível à identificação de componentes desconhecidos em uma solução por seus espectros característicos ao ultravioleta, visível, ou infravermelho. A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/Vis) é umas das técnicas analíticas fundamentais amplamente utilizadas em laboratórios de área básica, bem como em análises clínicas, sendo empregada nas determinações analíticas em diversas áreas. É extremamente valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula por constituir-se em uma técnica que pode ser aplicada para determinações tanto de compostos de caráter orgânico quanto inorgânico, de modo que seu emprego se dá tanto em análises qualitativas quanto quantitativas. Todavia, por possibilitar uma alta sensibilidade de análise, com alto grau de precisão e exatidão em suas medidas, é empregada de maneira mais extensiva em determinações quantitativas (SANTOS; NEVES; BRANCO, 2010).

A técnica de espectrofotometria UV-Vis utiliza a radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta-visível, obtendo dados quantitativos da amostra. O método mede a radiação monocromática absorvida pelo analito, por meio das transições eletrônicas entre os níveis energéticos moleculares. Segundo a Lei de Beer-Lambert, equação 4, a absorbância de uma solução é proporcional à concentração da espécie absorvente.

$$A = \varepsilon b c \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

$\varepsilon$  = é a absorvidade molar ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );

$b$  = é o caminho óptico (cm);

$c$  = é a concentração do soluto ( $\text{molL}^{-1}$ ).

### 3.9 Análises das propriedades físico-químicas das amostras de etanol

As amostras foram submetidas às análises de cor, aspecto, medidas de potencial hidrogeniônico (pH), espectrofotômetro no visível e condutividade. Devido à pequena quantidade de etanol produzido os ensaios foram realizados em triplicata.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico são apresentadas as condições em que os experimentos foram submetidos, como os equipamentos e materiais utilizados para a análise e o estudo das rotas de hidrólise ácida e enzimática empregadas no processo de fermentação da farinha de *Cyperus esculentus*.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal e as análises de UV-Vis no Laboratório de Eletroquímica, ambos situados no Câmpus CEDETEG, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, na cidade de Guarapuava - PR.

### 4.1 Local do experimento

A erva daninha *Cyperus esculentus* foi cultivada em um canteiro de dimensão 1m x 2 m, no Centro Estadual de Educação Profissional Arlindo Ribeiro, localizado no município de Guarapuava-PR, visto que esta encontra-se presente no campo destinado ao cultivo de produtos agrícolas. A colheita foi realizada com equipamentos necessários para a extração de erva daninha, no período de fevereiro a março de 2012.

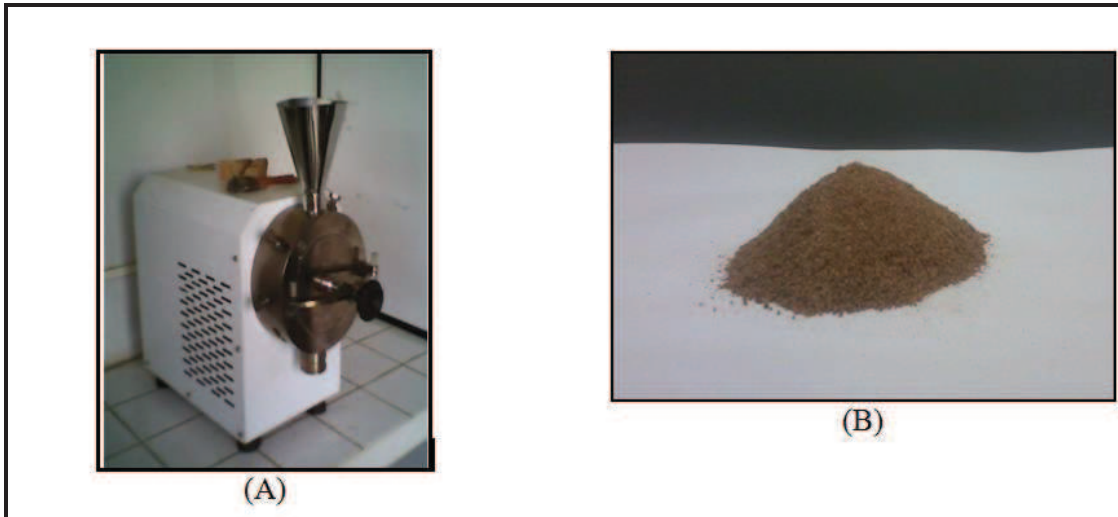
### 4.2 Caracterização da matéria-prima

Para a caracterização da matéria-prima determinou-se três parâmetros: teor de umidade, teor de amido e açúcares redutores. Para a realização do procedimento metodológico, seguiu-se o Método de Lane-Eynon, com os reagentes de Fehling, do Instituto Adolf Lutz (IAL) (IAL, 1976; DEMIATE, et al., 2002).

#### 4.2.1 Determinação da umidade

Após a colheita, as amostras foram inicialmente lavadas abundantemente com água e submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 105 °C, até peso constante, por um período aproximado de 48 horas, visando sua desidratação. Em seguida, os tubérculos foram moídos em um moinho de facas, com rotor circular e peneira de 5 mm (figura 16), no Laboratório de Ciências Florestais e Ferrageiras, também situado no Câmpus CEDETEG, da Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO. Após a moagem as amostras foram submetidas a um processo de peneiração, obtendo-se as partículas finas da farinha da erva

daninha por meio do processo de trituração. Em seguida o substrato foi acondicionado em recipientes âmbar, os quais foram envolvidos com papel alumínio e armazenados em geladeira, para análises posteriores.



**Figura 16** - (A) moinho de facas; (B) farinha de *Cyperus esculentus*.

#### 4.2.2 Determinação de açúcares redutores

Para a determinação de açúcares redutores (AR) nas amostras da farinha de *Cyperus esculentus*, utilizou-se a metodologia analítica de titulação de Lane-Eynon, do Instituto IAL, que consiste no uso do chamado licor de Fehling (solução A + solução B).

No método supracitado, o  $\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ , azul característico do íon cúprico do reativo de Fehling (solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio) é reduzido a óxido cuproso  $\text{Cu}^{+}_{(\text{aq})}$ , um precipitado de óxido de cobre de coloração tijolo (SILVA et al., 2003).

Para proceder à determinação de AR, preparam-se as soluções de Fehling A, composta de sulfato de cobre e hidróxido de sódio, e Fehling B, composta de sal duplo de tartarato de sódio e potássio, com a função de complexar os íons de cobre na solução. Ao proceder o aquecimento destas soluções, ocorre a oxidação dos açúcares bem como a redução do cobre, resultando no precipitado da titulação (TAVARES et al., 2010).

O Licor de Fehling é obtido na titulação por meio da mistura das soluções A e B. A solução A foi obtida pela dissolução de 34,639g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em 500 mL de água destilada. A solução B foi obtida pela dissolução de 173g de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 250 mL de água destilada e

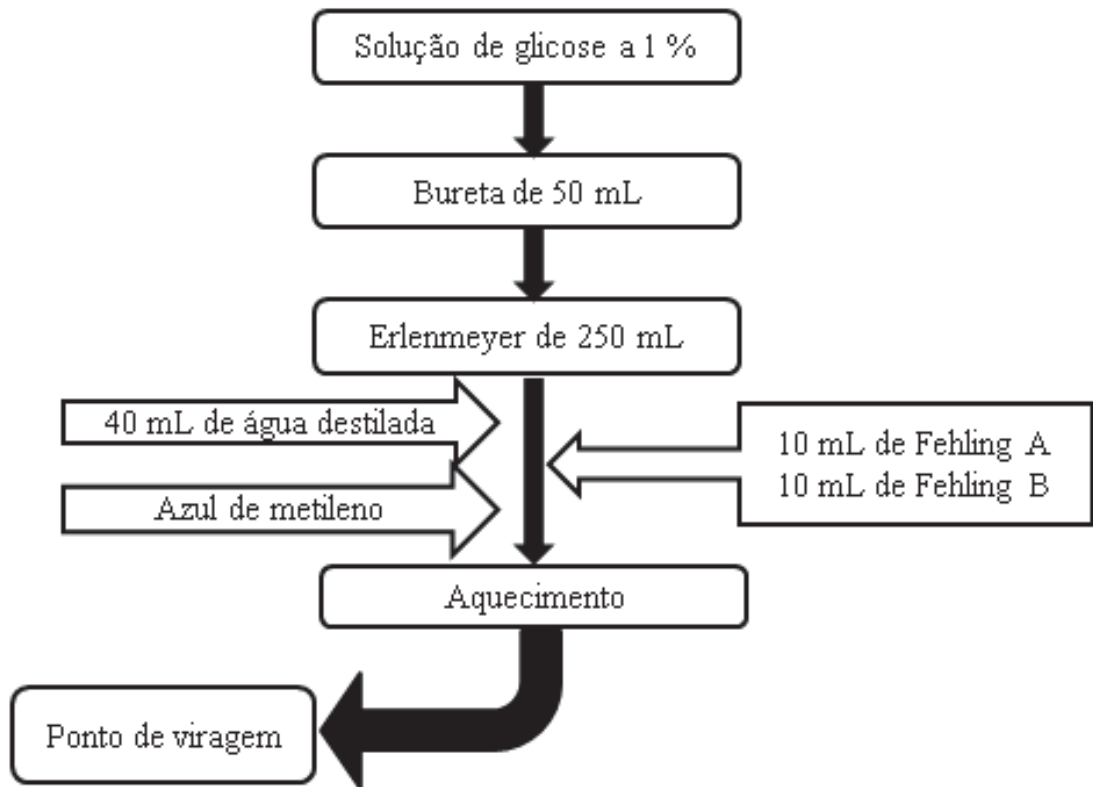
250 mL de solução de hidróxido de sódio a 20% (m/v), preparada pela dissolução de 50 g de NaOH em 250 mL de água destilada. A figura 17 traz os preparados com as soluções de Fehling A e B.



**Figura 17** - Soluções de Fehling A e B (COSTA, 2010).

Primeiramente, as soluções de Fehling A e B foram padronizadas com uma solução de D-glicose a 1% (m/v), a qual foi o analito no interior da bureta.

Na figura 18 é representado o fluxograma para tal processo.



**Figura 18** – Fluxograma para padronização dos Fehling A e B.

Procedeu-se a titulação para padronização dos Fehling, sendo esta realizada em triplicata e o valor médio do volume gasto foi utilizado para determinar o Fator de Fehling (F), de acordo com a equação 5, o azul de metileno indica o ponto final da titulação.

$$F = \frac{V \cdot P}{100} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

F = fator dos Fehling;

P = massa da amostra;

V = quantidade de mL gastos na titulação.

A partir da equação 5, obteve-se o fator de Fehling, igual a 0,0475.

Para a determinação de AR procederam-se as titulações, onde a amostra foi gotejada na mistura dos Fehling (solução de Fehling A + solução de Fehling B), todas as análises foram realizadas em triplicata. Este processo assemelha-se a padronização dos Fehling, exceto pela filtração da solução da farinha de tiririca, o fluxograma do processo esta apresentado na figura 19, a figura 20 ilustra o processo de determinação de açúcares redutores.

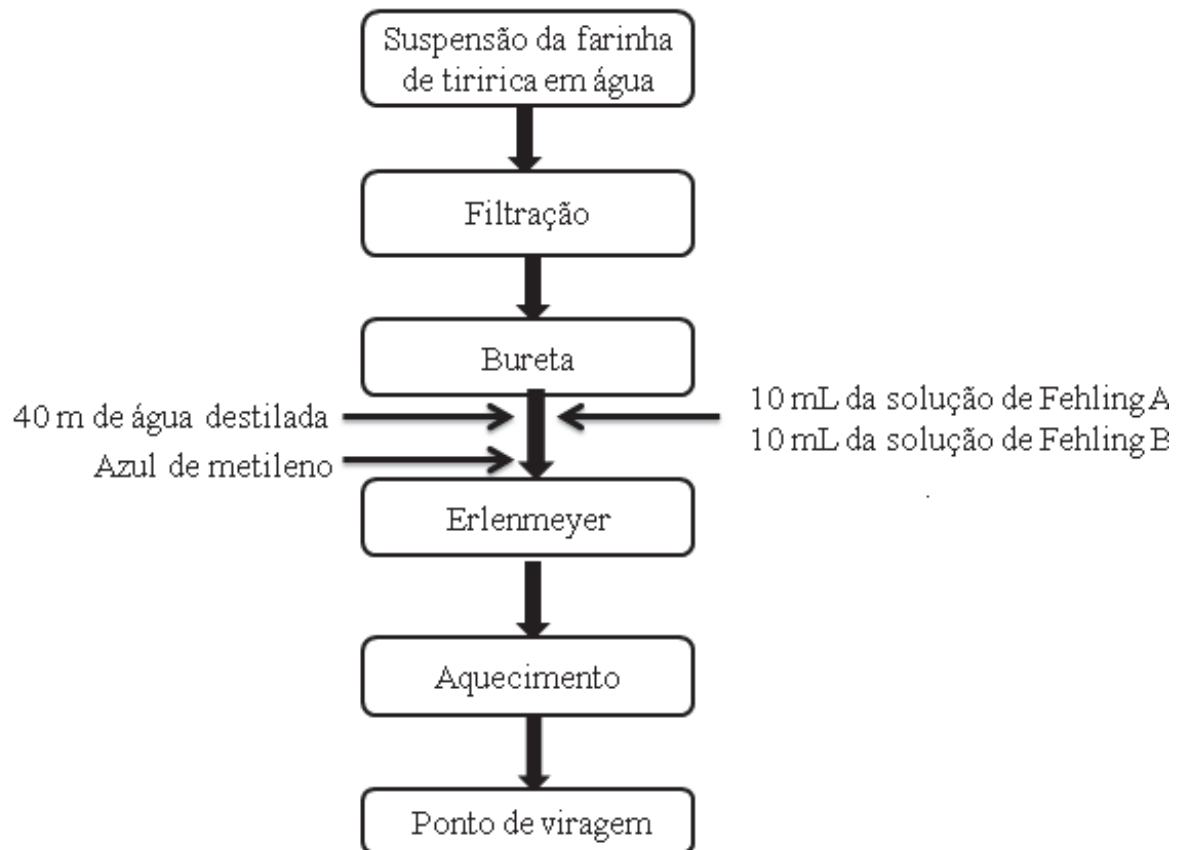


Figura 19 - Fluxograma determinação de açúcares redutores.



Figura 20 – (A) titulação; (B) ponto de viragem (COSTA, 2010).



Por meio da equação 6, calculou-se a porcentagem de açúcares redutores nas amostras.

$$AR = \frac{100 \cdot A \cdot F}{V \cdot P} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

A = diluição da amostra;

F = padronização dos Fehling, Fator Fehling;

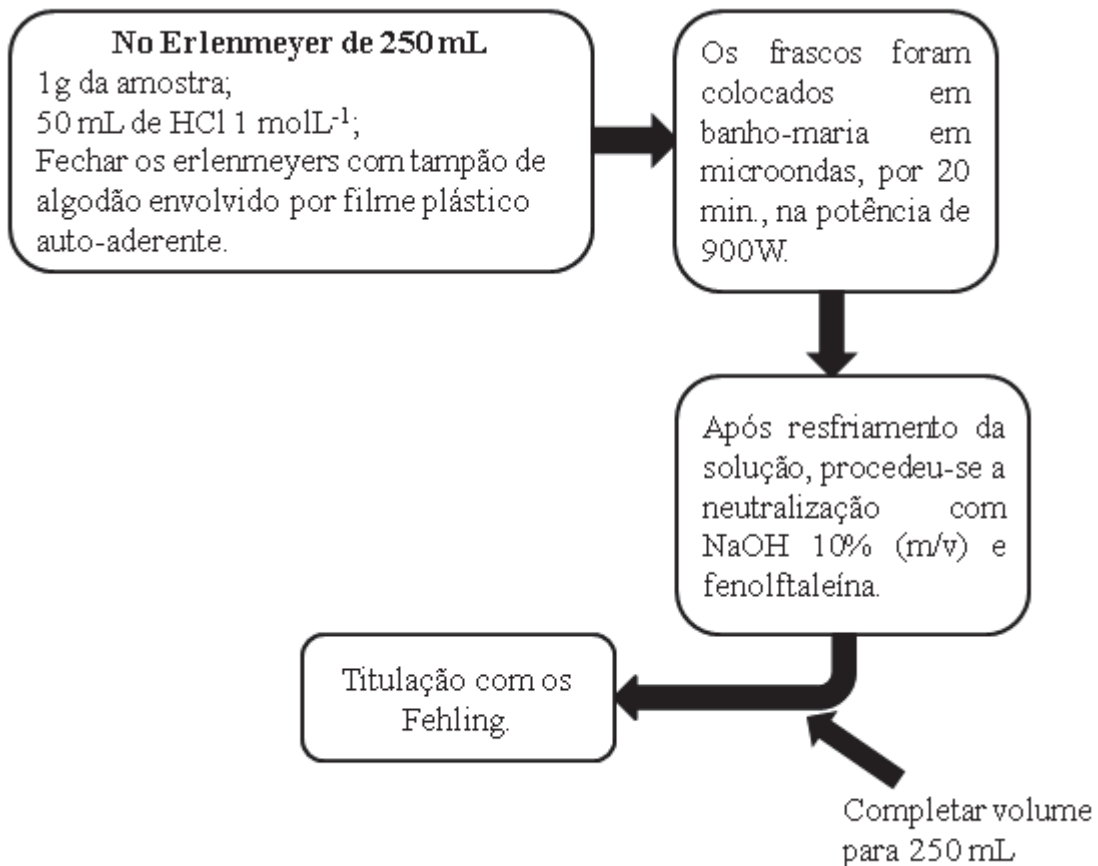
P = massa da amostra em g;

V = volume em mL gastos na titulação.

#### 4.2.3 Determinação de amido

Os métodos para dosagem de amido mais empregados são o enzimático e o ácido; estes dosam a partir dos seus açúcares redutores, porém, apresentam vantagens e desvantagens. O método enzimático é caro e exige maior atenção. Este estudo apresenta um método ácido acessível, que substitui a autoclave por um microondas, dispensando também o uso de espectrofotômetro, equipamentos com custo elevado (COSTA, 2010).

Para a dosagem do amido nas amostras dos tubérculos da tiririca, inicialmente procedeu-se a hidrólise prévia, em meio fortemente ácido, em microondas, visando a digestão ácida para a transformação do amido em açúcares redutores e posterior neutralização com hidróxido de sódio a 10% (m/v), para prosseguir a análise de açúcares redutores, a figura 21 apresenta o fluxograma do processo utilizado. Posteriormente, utilizou-se a metodologia de Lane-Eynon, o qual baseia-se na redução do  $\text{Cu}^{+2}$  (Fehling) a óxido cuproso. O azul de metileno indica o ponto final, por meio da redução causada pelo excesso de açúcar redutor (CEREDA; VILPOUX, 2003; GONÇALVES et al., 2009).



**Figura 21** – Fluxograma representativo do preparo das amostras para determinação de amido.

A percentagem de amido (% Amido) presente nas amostras foi determinada pela equação 7.

$$\%Amido = \frac{250 \cdot F \cdot 0,9 \cdot 100}{V \cdot P} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

250 = volume total da diluição da fécula (mL);

F = fator dos Fehling;

P = é a massa da amostra usada;

V = volume em mL gastos na titulação;

0,9 = fator que quantifica açúcares redutores em amido;

100 = é para expressar o amido em porcentagem da amostra.

Após determinação do teor de amido as amostras foram hidrolisadas, visando à obtenção de etanol.

### 4.3 Processos de obtenção de etanol

A figura 22 apresenta as etapas do processo fermentativo para obtenção de etanol a partir da *Cyperus esculentus*.

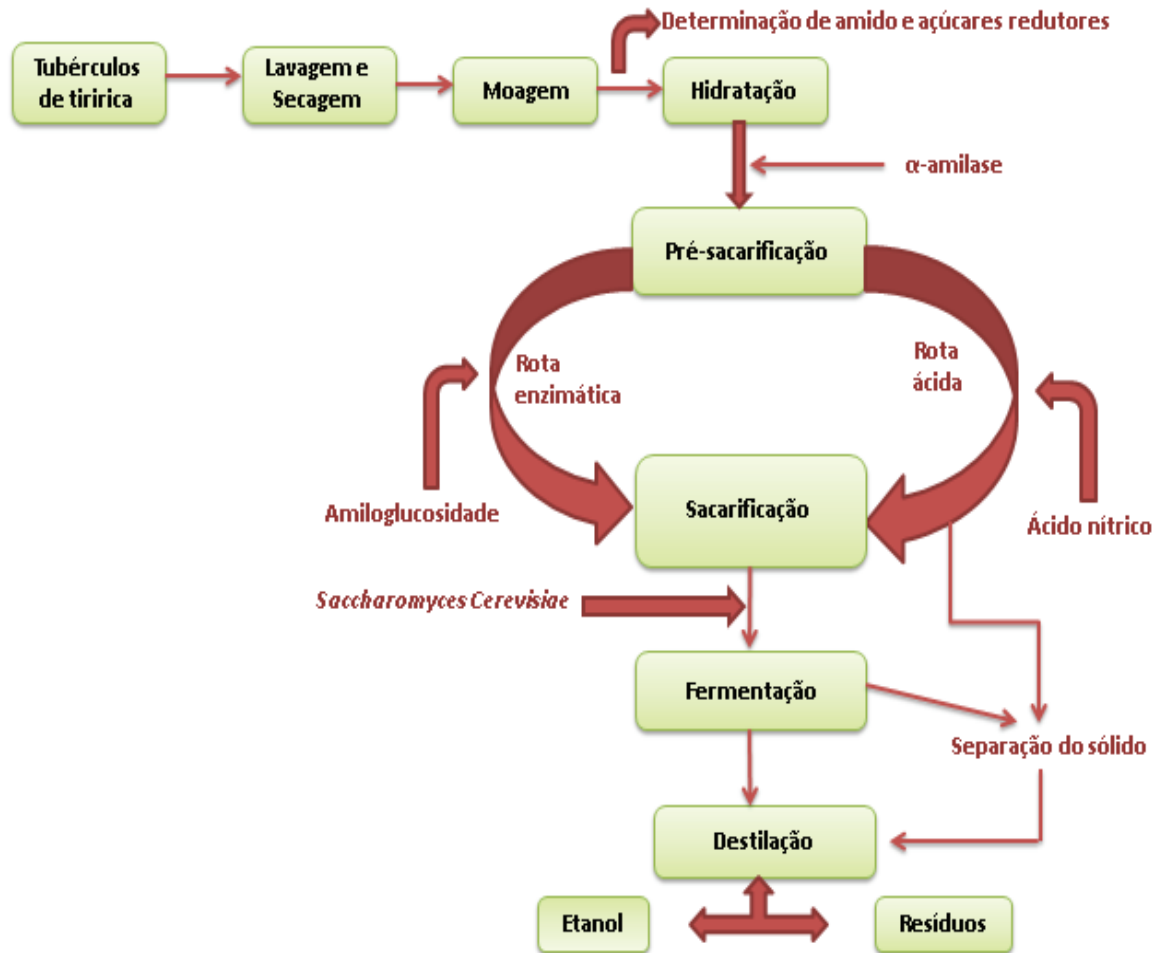


Figura 22 - Fluxograma das etapas do processo fermentativo.

#### 4.3.1 Hidrólise

Para a obtenção do etanol a partir do amido presente nos tubérculos da *Cyperus esculentus*, foi necessário este passar por um processo de hidrólise prévia de suas moléculas, para a conversão em açúcares simples e posterior fermentação. Foram realizados ensaios em ambas as rotas enzimática e ácida, de modo que para a primeira utilizou-se enzimas purificadas Sigma-Aldrich ( $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase) e para a segunda foi empregado o ácido nítrico  $12 \text{ molL}^{-1}$ .

#### 4.3.1.1 Hidrólise enzimática

As enzimas foram adicionadas ao meio em condições específicas para o seu desenvolvimento, aprimorando sua peculiaridade (PAVLAK et al., 2011). Para a obtenção do hidrolisado, pesou-se 3,0 g da farinha de tiririca e acrescentou-se 50 mL de tampão de McIlvaine, em pH 5,6.

O tampão foi preparado pela mistura de soluções de ácido cítrico  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,2 \text{ molL}^{-1}$ . Seu uso visa melhorar o desempenho das enzimas, quais foram utilizadas nas proporções equivalentes para cada grama de amido, nas concentrações 750 U e 0,5 U (unidades) de enzima, equivalente a  $57 \text{ }\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilase e  $13 \text{ }\mu\text{L}$  de amiloglucosidase (STROPARO, 2011).

Todos os reagentes utilizados no processo são de grau de pureza analítica.

Na figura 23 esta representado a hidrólise do material amiláceo realizada em banho termostático da QUIMIS, modelo banho-maria 0334M – 28.



**Figura 23** - Hidrólise do material amiláceo em banho termostático.

A mistura (tiririca + tampão de McIlvaine) foi submetida a aquecimento a 90 °C para geleificação do amido por aproximadamente 1 hora, após, adicionou-se a enzima  $\alpha$ -amilase na concentração de 57  $\mu\text{Lg}^{-1}$ , mantendo-se a mistura nesta temperatura por mais 1 hora sob agitação e homogeneização do meio, executadas em intervalos de 15 minutos, para a hidrólise da cadeia linear do amido. Em seguida, o meio foi resfriado até a temperatura ambiente e o pH foi ajustado empregando-se ácido clorídrico 1  $\text{molL}^{-1}$ , obtendo-se as condições ótimas de atuação da enzima amiloglicosidase, que situam-se entre os pHs 4,0 e 4,5. A temperatura foi reduzida para 60 °C e a enzima amiloglicosidase foi adicionada, na concentração de 13  $\mu\text{Lg}^{-1}$ . Esta temperatura foi mantida por 1 hora sob agitação em intervalos de 15 minutos, figura 24, a fim de que as dextrinas produzidas pela primeira enzima pudessem ser hidrolisadas em monômeros de glicose (PAVLAK et al., 2011).

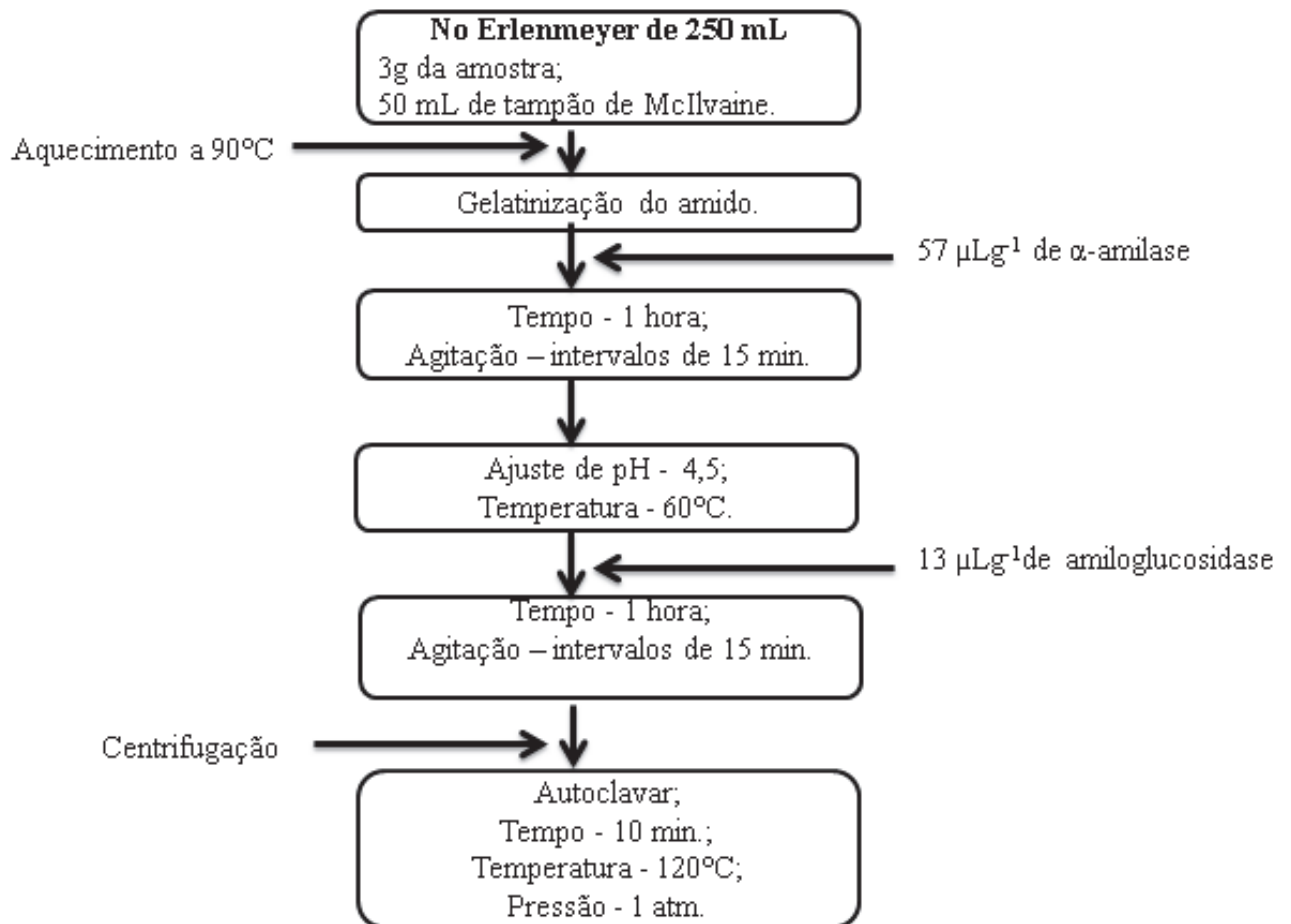


Figura 24 – Fluxograma hidrólise enzimática.

#### 4.3.1.1.1 Preparo do mosto

Após a etapa de hidrólise o mosto foi resfriado a uma temperatura aproximada de 30 °C, este foi centrifugado em uma centrífuga Hettich Zentrifuger MIKRO 220R em rotação de 3000 Hz durante 5 minutos, para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume foi completado com água destilada, posteriormente a solução foi homogeneizada e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. O pH do mosto permaneceu na faixa entre 4,0 e 5,0.

Os erlenmeyers foram fechados com papel kraft e colados com fita adesiva autoclavante, sendo então autoclavados por um período de 10 minutos, à pressão de 1 atm e temperatura de 120 °C, em uma autoclave vertical modelo CS da Primatec Autoclaves. Após descompressão desta, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente (27 °C).

#### 4.3.1.1.2 Ensaio de fermentação

Para a análise de todas as variáveis e relações entre estas, foi realizado um estudo preliminar utilizando as variáveis de concentração e tempo, com o objetivo de saber quais regiões seriam estudadas. A partir desses dados foi possível montar um planejamento experimental cúbico de face centrada  $2^3$ , com ponto central, com auxílio do software Design Expert<sup>®</sup>, para avaliar as condições favoráveis de fermentação. As variáveis e níveis estudados para a hidrólise enzimática estão representados na tabela 5.

**Tabela 5** - Análise Multivariada.

Variáveis	(+)	(-)
Concentração (gL <sup>-1</sup> )	15	5
Tempo (h)	48	24
Centrifugação	Com	Sem

Neste planejamento foram feitas as otimizações necessárias, objetivando os maiores rendimentos.

Para o processo fermentativo, foram utilizadas linhagens de leveduras comerciais da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, da marca Fleishmann<sup>®</sup>, armazenadas em temperatura ambiente. A levedura foi adicionada ao meio nas concentrações correspondentes a 5, 10 e 15 gL<sup>-1</sup>, em seguida, as amostras foram fechadas com algodão hidrofílico e filme de PVC e submetidas a passagem de nitrogênio (N<sub>2(g)</sub>) durante 10 minutos, para melhor atividade do microorganismo, devido seu processo de fermentação ser promissor em meio anaeróbico. As amostras foram mantidas em estufa estabilizada a uma temperatura aproximada de 36° C nos

tempos de fermentação em estudo 12, 24, 36 e 48 horas. Os fermentados foram submetidos a destilação em aparatos de destilação simples, os destilados foram armazenados em recipientes âmbar para análises posteriores.

#### 4.3.1.2 Hidrólise ácida

A partir de dados da literatura foi possível realizar um planejamento experimental para nortear os ensaios de hidrólise via rota ácida. Visando obter condições experimentais favoráveis, com desejáveis teores de álcool nas amostras obtidas a partir desta rota, realizou-se um planejamento fatorial  $2^2$  considerando dois níveis e duas variáveis. Este planejamento foi importante para analisar as influências de uma ou mais variáveis, sujeitas a todas as combinações das demais, na resposta de um processo. Verifica-se na tabela 6 que foram analisadas as variáveis tempo e temperatura de hidrólise.

**Tabela 6** – Intervalo das variáveis no processo de hidrólise.

VARIÁVEIS	(+)		(-)
Tempo (min.)	9	7	5
Temperatura (°C)	50	45	40

Para obtenção do hidrolisado, pesou-se 1 g da farinha de tiriçica e adicionou-se 10 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )  $12 \text{ molL}^{-1}$ .

Todos os reagentes utilizados no processo são de grau de pureza analítica.

A figura 25 representa a hidrólise do material amiláceo realizada em banho termostático. A mistura foi submetida a aquecimento nas respectivas temperaturas de  $40^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$  e  $50^\circ\text{C}$ , nos diferentes tempos de 5, 7 e 9 minutos. Após aguardar os tempos de hidrólise do amido, adicionou-se em cada erlenmeyer 135 mL de água destilada (GOUVEIA et al., 2009).



Figura 25 - Amostras no banho termostático (hidrólise ácida).

Em seguida, os erlenmeyers foram fechados com papel kraft e fita adesiva de uso exclusivo em autoclaves e autoclavados por 10 minutos, à pressão de 1 atm e à 120 °C, em uma autoclave vertical modelo CS da Primatec Autoclaves. Após descompressão da mesma, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente (27 °C). A solução foi então filtrada em papel de filtro qualitativo, para a separação da fração sólida da fração líquida.

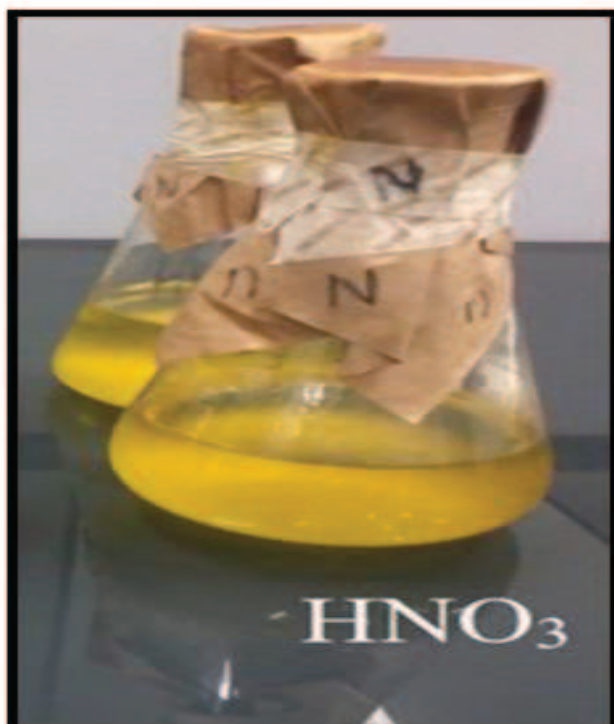


Figura 26 - Amostras autoclavadas.



As amostras hidrolisadas apresentaram uma coloração amarelada, possivelmente devido o desprendimento de dióxido de nitrogênio, o qual possui coloração castanho-avermelhada, sendo um poderoso oxidante nas reações atmosféricas.

#### 4.3.1.2.1 Preparo do mosto

Em cada erlenmeyer de 250 mL contendo o mosto foi adicionado 115 mL de água destilada, o pH foi ajustado com uma solução de NaOH 26% (m/v), para atividade da levedura (GOUVEIA et al., 2009).

#### 4.3.1.2.2 Ensaio de fermentação

Para realizar os ensaios de fermentação da rota ácida, utilizou-se o melhor ensaio da rota enzimática, ou seja, tempo de fermentação 24 h e concentração de levedura 15 gL<sup>-1</sup>. Foram utilizadas linhagens de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* da marca Fleishmann®, armazenadas em temperatura ambiente (27°C). A levedura foi adicionada ao meio, em seguida as amostras foram fechadas com algodão hidrofílico e filme plástico auto aderente, submetidas a passagem de nitrogênio, N<sub>2(g)</sub>, durante 10 minutos, para atividade da levedura, devido o processo de fermentação ser promissor em meio anaeróbico. As amostras foram incubadas e mantidas em estufa com temperatura estabilizada de 36° C, por 24 h. Após o tempo de fermentação, as amostras foram destiladas e o destilado foi armazenado para análises posteriores.

#### 4.4 Destilação

Após completar os tempos de fermentação em estudo as amostras foram retiradas da estufa e transferidas para um balão de destilação de 250 mL, o qual foi acoplado em aparatos de destilação (figura 27). O processo de destilação permite que os compostos presentes nas amostras mais voláteis, sejam liberados com facilidade na forma de vapor. A destilação procedeu-se na faixa de 75 °C a 80 °C.



**Figura 27** – Aparato de destilação.

Foi utilizada a destilação simples, nestes aparatos citados, entre o balão e o condensador foi acoplado um bulbo e um tubo de vidro que auxiliou no processo de destilação, permitindo a passagem do álcool para o condensador, bem como evitando a passagem de gotículas. As três frações foram consideradas no procedimento da destilação (Cabeça - 15% do volume destilado, Coração - 60% do volume destilado e Cauda - 15% do volume destilado). A temperatura influenciou na composição de cada fração.

No início do processo, ao cair as primeiras gotas do destilado, foi retirado o balão e colocado outro, o tempo de destilação foi de aproximadamente de 1 hora e após este período o balão foi retirado e novamente outro foi colocado para a destilação das gotas finais, por mais 30 minutos.

O destilado foi recolhido em um balão de 100 mL em banho de gelo, condicionando a estabilidade no estado líquido. As amostras destiladas foram identificadas e armazenadas em geladeira para posterior determinação do teor alcóolico em °GL e análises físico-químicas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### 4.5 Teor alcoólico

Para a determinação do teor alcoólico dos destilados seguiu-se a norma NBR 13920 (ANP, 2010).

Para este ensaio, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis da Spectrum UV-Vis, spectrophotometer SP 2000 UV, no comprimento de onda  $\lambda = 600$  nm, acoplado a um microcomputador contendo o software do aparelho. Para os ensaios, a cubeta de quartzo era previamente limpa e seca para evitar possíveis alterações nos resultados, provenientes de impurezas. Nesta foi colocado à amostra a ser analisada e o espectro foi obtido via software do aparelho.

##### 4.5.1 Espectrofotometria UV-Vis

Este método de determinação fundamenta-se na oxidação do etanol pelo dicromato de potássio, formando compostos coloridos. A intensidade desta coloração, na faixa de 600 nm, corresponde à concentração de etanol presente na amostra analisada. Nos ensaios foram empregadas soluções de dicromato de potássio a 10 % (m/v), solução padrão de etanol absoluto e ácido sulfúrico concentrado.

Para o preparo da solução de dicromato de potássio, diluiu-se 10,0 g deste composto em água destilada, transferiu-se então para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. A solução padrão de etanol foi preparada com 0,190 mL de etanol absoluto, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água destilada.

Para o preparo da curva-padrão, prepararam-se quatro soluções e um branco, em tubos de ensaio. Os procedimentos de preparo das soluções foram:

Solução 1 – 1,0 mL da solução padrão e 4,0 mL de água destilada (corresponde a 3,0 mg de etanol);

Solução 2 – 2,0 mL da solução padrão e 3,0 mL de água destilada (corresponde a 6,0 mg de etanol);

Solução 3 – 3,0 mL da solução padrão e 2,0 mL de água destilada (corresponde a 9,0 mg de etanol);

Solução 4 – 4,0 mL da solução padrão e 1,0 mL de água destilada (corresponde a 12,0 mg de etanol);

Solução branco – 5,0 mL de água destilada (corresponde a 0,0 mg de etanol).

Posteriormente, em cada tubo de ensaio foi adicionado lentamente 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e, após 1 minuto, adicionou-se 1,0 mL de dicromato de potássio 10%. Os tubos foram agitados e resfriados até atingir a temperatura ambiente. Após o resfriamento, foi transferido para uma cubeta de quartzo de 1 cm<sup>3</sup> 1,0 mL de cada solução. Esta foi levada para análise no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda  $\lambda = 600$  nm.

O etanol obtido da fermentação da farinha de tiritica foi caracterizado utilizando-se 0,02 mL do destilado, o qual foi diluído para 5,0 mL de água destilada, seguindo-se o procedimento acima citado e, leitura no espectrofotômetro UV-Vis em 600 nm, em função do branco.

Os valores de absorbância referentes às amostras dos destilados foram colocados na regressão da curva padrão, possibilitando o cálculo da quantidade de etanol da alíquota em mg, presentes nas amostras analisadas. A determinação do teor alcoólico, em °GL foi obtida empregando a equação 8.

$$E = \frac{5000 \cdot E'}{0,7834 \cdot 1000} \quad \text{ou} \quad E = 6,323 \cdot E' \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

E = teor de etanol na amostra, em mL/100 mL (°GL)

E' = mg de etanol na alíquota, conforme leitura na curva-padrão

5000 = fator de conversão da alíquota de 0,020 mL para 100 mL

1000 = fator de conversão de mg para g

0,78934 = densidade do etanol a 20°C, em g.mL<sup>-1</sup>

A partir da curva de calibração foi determinado o teor alcoólico das amostras analisadas.

## 4.6 Análises físico-químicas das amostras de etanol

### 4.6.1 Cor e aspecto

As determinações da cor visual e aspecto das amostras foram feitas em um recipiente, com a amostra contra a luz, observando cuidadosamente a presença de impurezas e/ou água no fundo do recipiente e a coloração do produto (ANP, 2009).

#### 4.6.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

Este método consiste na medição da diferença de potencial entre os eletrodos de pH (trabalho ou indicador) e de referência prata/cloreto de prata. O valor de pH obtido por este método não é comparável a valores de pH em soluções aquosas.

Para a determinação do pH foi utilizado um pHmetro do tipo Digimed DM 20, o qual foi calibrado com padrões específicos antes de qualquer ensaio executado, seguindo-se a norma NBR 10891 (ANP, 2010).

#### 4.6.3 Massa específica

A densidade é dada pela relação entre a massa específica do combustível a 20 °C e da água a 4 °C, a qual deverá ser corrigida com o auxílio de uma tabela de conversão, obtendo a densidade a 20 °C, seguindo-se as normas ASTM – D4052 e NBR – 5992 e 15639 (ANP, 2009).

Para este ensaio foi utilizado um picnômetro de 10 mL de volume (figura 28). Obteve-se a densidade relativa por meio da pesagem do picnômetro previamente calibrado, com água destilada e posteriormente com o líquido cuja densidade se deseja determinar, a 20 °C.



**Figura 28** – picnômetro.

Pesou-se o picnômetro vazio em uma balança analítica ( $m_1$ ). Posteriormente colocou-se o líquido a ser determinado até completar todo o volume, tomou-se cuidado para não

formar bolhas, pois isso acarretaria em erros nos resultados, a tampa foi colocada de maneira que o excesso de líquido escorresse pelo capilar, a parte externa foi secada com papel poroso, em seguida procedeu-se a pesagem ( $m_2$ ). Posteriormente a pesagem com água destilada ( $m_3$ ). A água foi utilizada como líquido padrão de referência. A equação 9 possibilitou o cálculo do valor da densidade relativa pelo quociente entre a massa do etanol e a massa da água.

$$\rho_{ETANOL, H2O} = \frac{m_{ETANOL}}{m_{H2O}} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

$m_{ETANOL} = m_2 - m_1$  é a massa do líquido que se deseja determinar a densidade que completa o volume (10 mL) do picnômetro.

$m_{H2O} = m_3 - m_1$  é a massa da água destilada que ocupa o mesmo volume.

#### 4.6.4 Condutividade

A condutividade elétrica mede a capacidade de condução de corrente elétrica de uma solução, em decorrência dos íons presentes nesta. Por meio de uma célula de condutividade elétrica de platina não platinizada com constante de  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ , e uma sonda com função de medir a temperatura, quais estarão ligados a um medidor de condutividade elétrica.

Para a determinação da condutividade empregou-se um condutivímetro do tipo Digimed DM 31. A condutividade foi verificada a partir do método tradicional para combustíveis, de acordo com a Norma NBR 10547 (ANP, 2010).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da farinha de tiririca

As farinhas de tiririca foram caracterizadas de acordo com três parâmetros – teor de umidade, de amido e de açúcares redutores.

#### 5.1.1 Teor de umidade

A tabela 7 apresenta a perda de água, obtida pela diferença de massa entre as massas úmidas e secas das amostras.

**Tabela 7** - Teores de massa fresca, seca e água dos tubérculos.

Amostras	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	% de água
01	121,16	63,13	58,07
02	226,61	174,17	52,44
03	430,09	235,23	54,69

De acordo com a tabela, obteve-se  $55,05 \% \pm 2,81$  (unidade) de umidade nos tubérculos. Tais valores foram satisfatórios quando comparado com outros tubérculos, como por exemplo, a mandioca (68,2%), (COSTA, 2010) e *Cyperus esculentus* L. (64,6%) (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008). Vale salientar que apesar do percentual médio de umidade citado, as amostras foram coletadas do mesmo canteiro, utilizando o mesmo tratamento no campo e mesmo procedimento durante a coleta. As diferenças apresentadas podem interferir na quantidade de etanol presente nos destilados, pois a presença de umidade após a colheita favorece as mudanças provenientes de processos fisiológicos.

#### 5.1.2 Teor de amido

Após padronização dos Fehling utilizados no procedimento experimental, procedeu-se a extração do amido dos tubérculos. Primeiramente, estes passaram por um processo ácido em microondas, após aguardar o tempo de hidrólise, a solução foi titulada com os Fehling para determinação da porcentagem de amido presente na farinha de tiririca. Esta determinação foi necessária para averiguar a disponibilidade de amido para futuras fermentações.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas, sendo utilizada a média do volume para calcular a porcentagem de amido (tabela8).

**Tabela 8** – Teor de amido nos tubérculos.

Massa da amostra (g)	Volume médio das titulações (mL)	Quantidade de amido (%)
1,010	21,57	49,07
1,001	18,8	56,79
1,010	20,23	50,871
1,010	19,5	52,78

De acordo com a tabela 8, observou-se que os teores de amido presente nos tubérculos utilizados neste trabalho apresentaram valores inferiores aos da literatura (MANEK et al., 2012), situando-se num valor médio igual a 52,38 %, com desvio padrão de  $\pm 3,31$ . Comparando com a quantidade presente em outras matérias-primas, como por exemplo, o trigo (65 a 72%), (Freitas et al., 2005), a *Cyperus esculentus L.* (46,99%) (MATOS; CAVALCANTI; PARENTE, 2008) e a mandioca 70% (BRASIL, 1978).

O rendimento foi satisfatório, apesar do valor encontrado ser inferior quando comparado a outros tubérculos, porém o valor foi superior quando comparado com dados encontrados na literatura para a erva daninha *Cyperus esculentus L.* De acordo com os resultados obtidos, a farinha de tiririca poderá ser uma excelente fonte amilácea, justificando o interesse por esta matéria-prima, apresentando um elevado potencial para a sua conversão por enzimas amilolíticas ou por ácidos, propiciando uma excelente fonte de carbono para diversos microorganismos, bem como condução de eficientes fermentações etanólicas.

Ressaltando que o método utilizado no processo de hidrólise, as diferenças nos percentuais, bem como as condições de cultivo (fertilização e irrigação do solo) podem alterar a quantidade de amido.

### 5.1.3. Teor de açúcares redutores

As titulações com os Fehling foram todas realizadas em triplicata, por meio da oxidação em meio alcalino dos monossacarídeos glicose e frutose, em presença de um agente oxidante (tabela 9).



**Tabela 9** – Teores de açúcares redutores nos tubérculos.

Massa da amostra (g)	Volume médio das titulações (mL)	Quantidade de açúcares redutores (%)
10,013	4,66	10,18
10,028	4,1	11,55
10,034	3,6	12,79
10,029	3,23	14,26
10,001	3,86	11,97
10,000	3,66	12,62

Também de acordo com resultados das determinações de açúcares redutores, verificou-se que os teores de açúcares presentes nos tubérculos da *Cyperus esculentus*, apresentaram um valor médio de 12,23%, com desvio padrão de  $\pm 1,76$ . A conversão eficaz em açúcares redutores determina a fermentação etanólica. O rendimento foi satisfatório quando comparado com o da mandioca, que é de 10,5%, (Cabelo, 2007). A análise dos parâmetros estudados objetivou o processo de conversão ácida e enzimática, e também a condução de fermentações etanólicas.

Após a determinação dos parâmetros acima citados, foi necessário realizar ensaios que permitissem a verificação da viabilidade das concentrações da levedura e dos tempos adequados para maiores teores de açúcares fermentáveis, via rota enzimática e ácida.

## 5.2 Ensaios de fermentação

### 5.2.1. Rota enzimática

Primeiramente, ensaios preliminares foram realizados variando 5 tempos: 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, e concentração de levedura igual a  $5\text{gL}^{-1}$ ,  $10\text{gL}^{-1}$  e  $15\text{gL}^{-1}$ . Estes resultados indicaram que em tempos próximos à 36h, o rendimento sempre será considerável. Após estes ensaios preliminares, realizou-se um planejamento experimental para as variáveis apresentadas na tabela 5, e os resultados encontrados por meio da curva de calibração (figura 29) obtida pela medida das amostras no UV-Vis, comprimento de onda  $\lambda = 600\text{ nm}$ , permitiram o cálculo do teor alcoólico dos ensaios realizados.

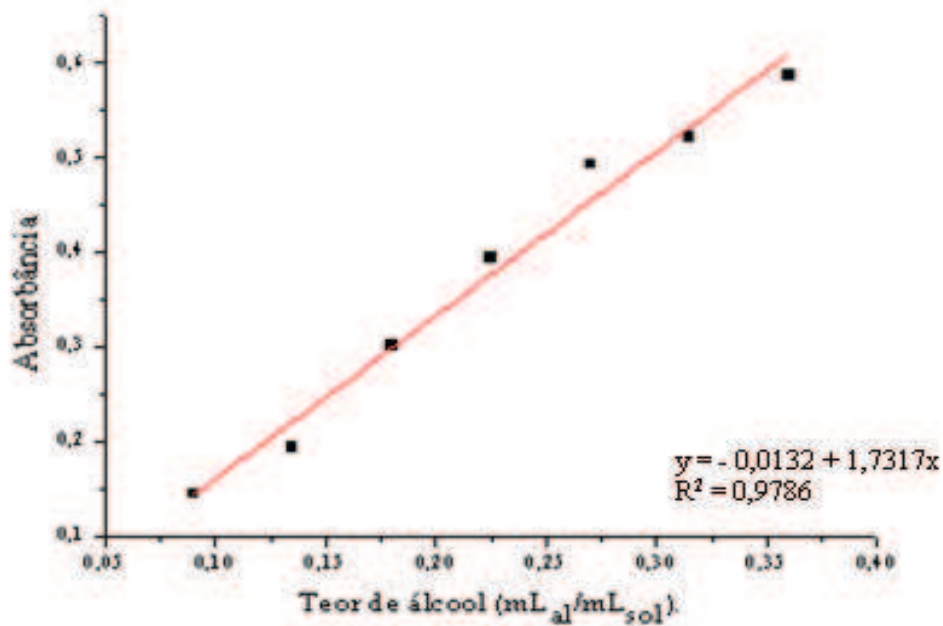


Figura 29 - Curva de Calibração rota enzimática.

A tabela 10 apresenta os resultados dos teores alcoólicos, obtidos por meio da curva de calibração.

Tabela 10 – Teores alcoólicos via rota enzimática.

Ensaio	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Centrifugação	Grau alcoólico (°GL)
1	5	24	Com	2,4
2	5	36	Com	4,7
3	5	48	Com	6,0
4	10	24	Com	9,5
5	10	36	Com	7,8
6	10	48	Com	4,8
7	15	24	Com	6,8
8	15	36	Com	7,2
9	15	48	Com	7,5
10	5	24	Sem	4,4
11	5	36	Sem	5,6
12	5	48	Sem	4,3
13	10	24	Sem	5,8
14	10	36	Sem	6,9
15	10	48	Sem	4,5
16	15	24	Sem	5,0
17	15	36	Sem	7,3
18	15	48	Sem	7,0

A partir destes resultados foi feita a otimização, com o auxílio do programa estatístico objetivando averiguar a tendência apresentada pelo sistema, buscando assim processos mais eficientes.

### 5.2.1.1 Planejamento experimental

A partir da análise de variância das respostas obtidas, na tabela 11 foi possível relacionar todas as variáveis, suas interações, seus respectivos efeitos e o p-valor. Para o limite de confiança estabeleceu-se 95%, os valores do p-valor para serem expressivos deveriam ser inferiores a 0,05. Desta maneira, observou-se que apenas uma das variáveis e suas respectivas interações foram significativas.

**Tabela 11** - Análise dos efeitos principais para a fermentação da farinha da *Cyperus esculentus* via rota enzimática a partir do primeiro planejamento fatorial.

Fatores e Interações	Efeito	p-valor
Média/Intercepção	8,98	0,2479
Y <sub>1</sub> – Concentração da levedura (g.L <sup>-1</sup> )	0,24	0,7863
Y <sub>2</sub> – Tempo de fermentação (horas)	0,099	0,9107
Y <sub>3</sub> – Centrifugação do mosto	- 0,12	0,8644
Y <sub>1</sub> .Y <sub>2</sub>	- 0,71	0,5146
Y <sub>1</sub> .Y <sub>3</sub>	- 0,34	0,7014
Y <sub>2</sub> .Y <sub>3</sub>	2,54	0,0136
<b>Desvio padrão = 2,99</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,4593</b>	<b>Erro padrão = 0,71</b>

Pela análise da tabela 11, pode-se observar que alguns efeitos e interações apresentaram valores negativos, indicando que o estudo deve prosseguir na direção de níveis menores (-1) enquanto que os positivos têm um efeito satisfatório para o lado dos níveis maiores (+1).

A razão das somas quadráticas (R<sup>2</sup>) apresentou um valor de 0,4593, representando que 45,93% da variação total em torno da média são explicados pela regressão do modelo proposto. Quanto ao desvio padrão e o erro padrão, nota-se que foram iguais para todos os fatores e suas interações.

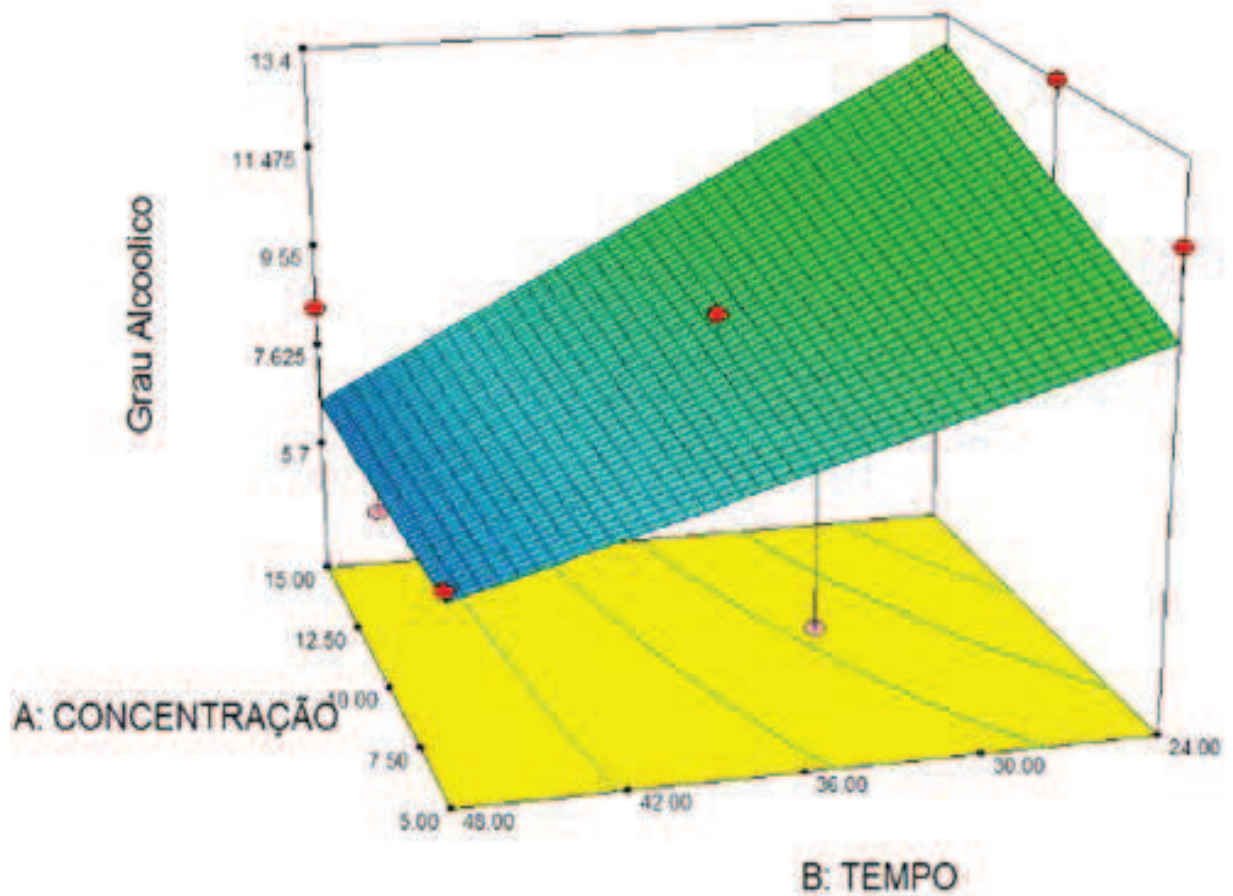
Em termos de fatores codificados, a equação 11 evidência o modelo de terceira ordem reduzida a partir dos efeitos e suas interações mostradas no delineamento experimental.

$$GA (^{\circ}GL) = 8,98 + (0,24.Y_1) + (0,099.Y_2) - (0,12.Y_3) - (0,71.Y_1.Y_2) - (0,34.Y_1.Y_3) + (2,54.Y_2.Y_3) \quad \text{(Equação 10)}$$

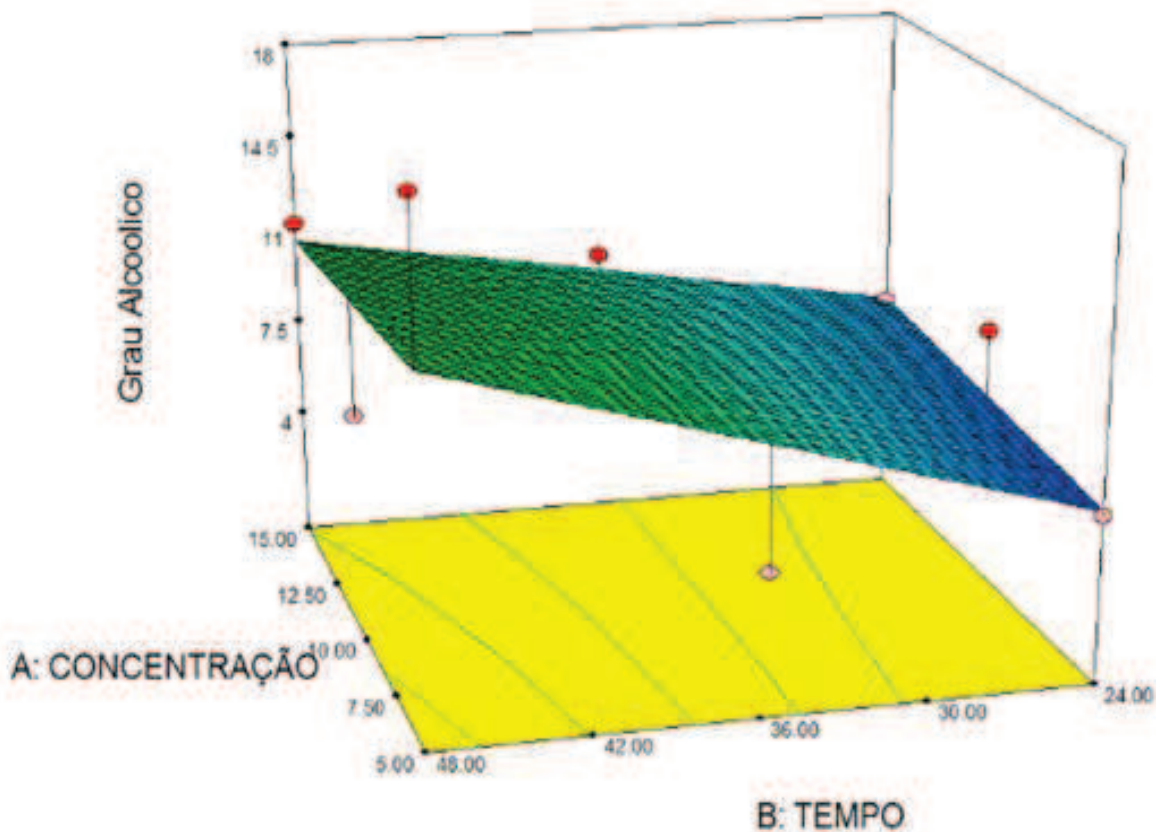
Por meio desta equação, nota-se que este modelo não é conclusivo, no entanto, expressa forte direcionamento para estudos futuros de aperfeiçoamento do processo de fermentação, sendo utilizadas para isto as variáveis tempo (Y<sub>2</sub>) e centrifugação do mosto (Y<sub>3</sub>), que demonstraram maior efeito para a fermentação da farinha da *Cyperus esculentus*, sendo

necessário seus aperfeiçoamentos para um maior rendimento e interação destes com a concentração da levedura ( $Y_1$ ).

Os gráficos de superfície de resposta para o grau alcoólico da *Cyperus esculentus*, com centrifugação do mosto e sem centrifugação deste, estão expostos nas figuras 30 e 31, respectivamente.



**Figura 30** – Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da  $Y_1$  (concentração) e  $Y_2$  (tempo reacional) com  $Y_3$  (centrifugação).



**Figura 31** - Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da  $Y_1$  (concentração) e  $Y_2$  (tempo reacional) com  $Y_3$  (sem centrifugação).

Observa-se proximidade nos valores dos teores alcoólicos, para os diferentes tempos de fermentação e concentração de levedura. Porém, constata-se que as amostras com o mosto não centrifugado apresentaram tempo demasiado de destilação e assim um gasto energético elevado inviabilizando o processo, sendo, portanto, descartadas. Os ensaios com centrifugação foram fixados considerando-se somente as variáveis: concentração e tempo.

A partir dos resultados obtidos, novos planejamentos foram realizados buscando obter rendimentos mais elevados. Para tanto, os ensaios foram realizados deixando como ponto central o tempo de fermentação de 24 h a concentração da levedura igual a  $15\text{gL}^{-1}$ .

Realizaram-se vários ensaios, sempre em triplicata, e todos passaram pelo modelo estatístico proposto pelo programa Design Expert®. A tabela 12 apresenta os resultados obtidos a partir da otimização realizada pelo delineamento estatístico.

**Tabela 12** - Resultados dos teores alcoólicos do planejamento fatorial.

Ensaio	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Grau alcoólico (%)	Desvio padrão (s)
1	10	12	0,48	± 0,564
2	15	12	7,0	± 0,989
3	20	12	5,34	± 1,32
4	10	24	6,21	± 0,127
5	15	24	29,08	± 1,62
6	20	24	4,16	± 1,59
7	10	36	21,48	± 1,43
8	15	36	10,52	± 1,60
9	20	36	6,36	± 1,216

Pela tabela 12 observa-se que o ensaio 5 apresentou os maiores rendimentos em teores alcoólicos. A tabela 13 apresenta a análise de variância das respostas obtidas, a relação entre as variáveis, suas interações, seus efeitos e o p-valor, considerando 95% de limite de confiança.

**Tabela 13** – Análise dos efeitos principais para o grau alcoólico de *Cyperus esculentus* via rota enzimática a partir do segundo planejamento fatorial.

Fatores e Interações	Efeito	p-valor
Média/Interceptação	24,81	0,0686
X <sub>1</sub> – Concentração da levedura (g.L <sup>-1</sup> )	1,58	0,6043
X <sub>2</sub> – Tempo de fermentação (horas)	4,31	0,1858
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	- 5,05	0,2035
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	- 5,49	0,2515
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	- 12,70	0,0262
<b>Desvio-padrão = 7,07</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,7585</b>	<b>Erro padrão = 3,23</b>

Pela tabela 13 verificou-se que os efeitos e interações calculados assemelham-se a tabela 11, indicando que para os valores negativos, os ensaios devem prosseguir na direção de níveis menores (-1), entretanto para os positivos, será promissor para os níveis maiores (+1).

A razão das somas quadráticas (R<sup>2</sup>) apresentou um valor de 0,7585, indicando que 75,85% da variação total em torno da média são explicados pela regressão do modelo proposto. Quanto ao desvio padrão e ao erro padrão, nota-se que foram iguais para todos os fatores e suas interações.

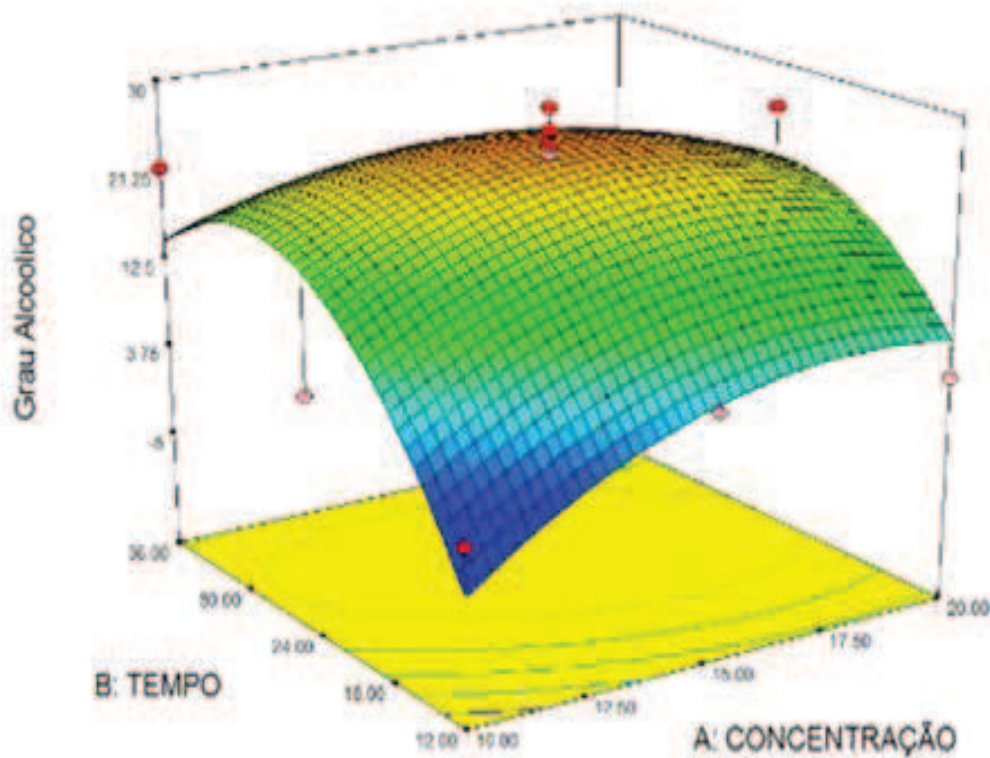
Os efeitos e suas interações evidenciados a partir do delineamento experimental estão representados na equação 11, em termos de fatores codificados.

$$GA (^{\circ}GL) = 24,85 + (1,58.X_1) + (4,31.X_2) - (5,05.X_1.X_2) - (5,49.X_1^2) - (12,70.X_2^2) \quad \text{(Equação 11)}$$

Pela equação 11 observa-se que os ensaios futuros de fermentação precisam ser aperfeiçoados, utilizando para isto as variáveis: tempo de fermentação (X<sub>1</sub>) e concentração de levedura (X<sub>2</sub>), as quais devem otimizadas para um maior rendimento em etanol.



A figura 32 apresenta o gráfico de superfície de resposta para a fermentação da rota enzimática, a partir da otimização do planejamento experimental.



**Figura 32** - Superfície de resposta para o grau alcoólico em função da  $X_1$  (concentração de levedura) e  $X_2$  (tempo reacional).

Pela figura 32 observa-se que os resultados obtidos com auxílio do programa Design Expert®, referentes a superfície de resposta, sugerem que as respostas mais eficientes, com maiores rendimentos para se obter o etanol a partir da fermentação do mosto da tiririca seriam nas seguintes condições de fermentação: concentração de levedura igual a  $15 \text{ gL}^{-1}$  e tempo de fermentação de 24 h, ponto central do planejamento utilizado. Nestas condições a concentração de glicose seria adequada, não inibindo o metabolismo da levedura.

### 5.2.2 Rota ácida

Para os estudos de todas as variáveis e as relações entre elas, via química foi realizado um planejamento experimental cubico de face centrada  $2^2$  da hidrólise do material amiláceo, para a fermentação desta via, o processo se deu nas mesmas condições estabelecidas pela via enzimática. A hidrólise realizada seguiu-se a metodologia imposta a partir da literatura (GOUVEIA et al., 2009).

Avaliaram-se os resultados das concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na ação fermentativa, visando à identificação de um rendimento satisfatório de etanol. A partir destes, os ensaios de fermentação foram realizados considerando o tempo de fermentação igual a 24 h e a levedura na concentração de  $15 \text{ gL}^{-1}$ . O pH foi ajustado para 4,5 de acordo com a metodologia encontrada na literatura, e a fermentação ocorreu de forma espontânea à temperatura de  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa estabilizada (GOUVEIA et al., 2009). Os volumes úteis para estas fermentações foram em torno de 250 mL, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A figura 33 apresenta a curva de calibração para a determinação dos teores alcoólicos da rota ácida.

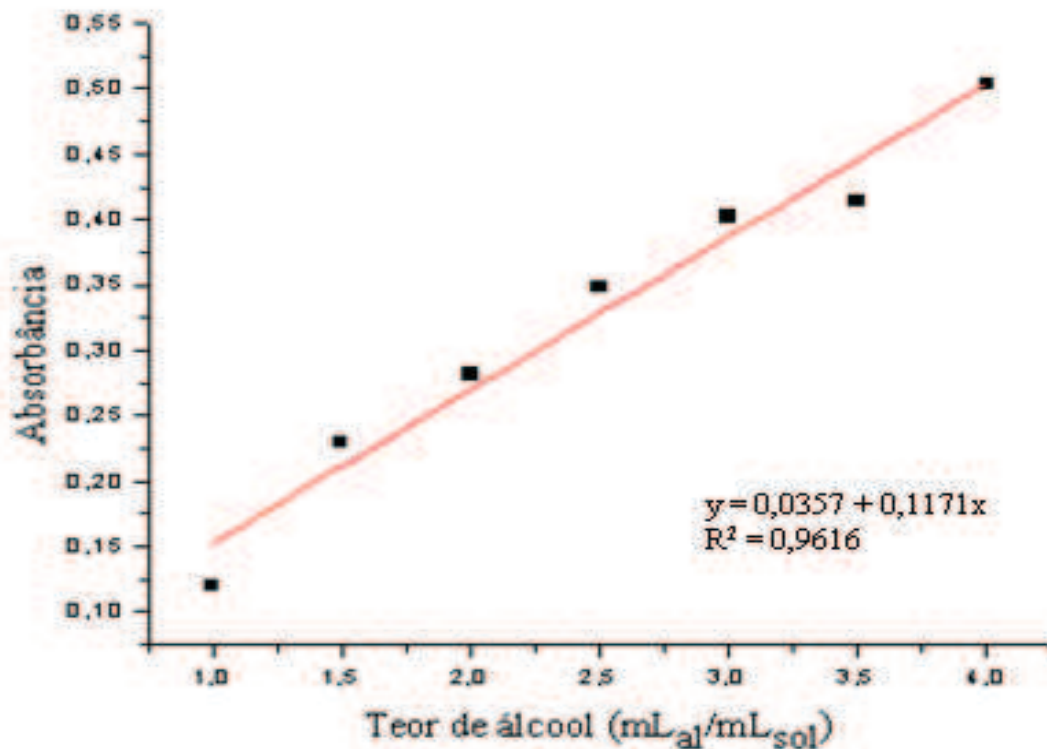


Figura 33 – Curva de Calibração rota ácida.



Os resultados encontrados por meio da curva de calibração, obtida pela medida das amostras no UV-Vis, com comprimento de onda  $\lambda = 600$  nm (figura 33), permitiram o cálculo dos teores alcoólicos dos ensaios realizados.

A tabela 14 apresenta a matriz experimental para o planejamento fatorial fracionário, bem como os resultados das fermentações com relação aos teores alcoólicos para os dois fatores estudados.

**Tabela 14** - Teores alcoólicos rota ácida - HNO<sub>3</sub>.

ENSAIOS	T(°C)	t (min)	Grau alcoólico (°GL)	Desvio padrão (s)
1	40	5	12,8	± 1,48
2	40	7	26	± 0,91
3	40	9	13,4	± 1,82
4	45	5	12,0	± 1,86
5	45	7	21,9	± 1,93
6	45	9	12,0	± 1,61
7	50	5	22	± 1,77
8	50	7	21,9	± 1,50
9	50	9	13,0	± 2,02

Pela tabela 14, pode-se observar que o ensaio 2 apresentou o maior valor de teor alcoólico, obtendo maior eficiência de hidrólise dos processos dos ensaios realizados. Conclui-se que os maiores rendimentos seriam próximos a 7 min e temperatura de hidrólise igual a 40 °C, obtendo-se um valor médio igual a 26 °GL.

A utilização do ácido nítrico no processo de hidrólise poderá estar associado a liberação de NO<sub>(g)</sub> e a formação de NO<sub>2(g)</sub>, tais estados de oxidação favorecem tanto a quebra da cadeia do amido quanto o processo fermentativo do mosto, por promover a formação de aminoácidos ou amídica (uréia), beneficiando a ação da *Saccharomyces cerevisiae*, concedendo um meio anaeróbico para seu desenvolvimento (GOUVEIA et al., 2009).

Na tabela 15 está representado os efeitos e as interações do obtidos por meio do planejamento experimental realizado para o processo de hidrólise ácida.

**Tabela 15** - Análise dos efeitos principais para o ácido nítrico a partir do planejamento fatorial.

<b>Fatores de Interação</b>	<b>Efeito</b>	<b>p-valor</b>
Média/Interpretação	21,34	0,1299
Y <sub>1</sub> – Temperatura (°C)	0,78	0,5907
Y <sub>2</sub> – Tempo (min)	- 1,40	0,3620
Y <sub>1</sub> .Y <sub>2</sub>	- 2,40	0,2302
(Y <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	2,88	0,2919
(Y <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	- 9,07	0,0278
<b>Desvio-Padrão = 3,20</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,8775</b>	<b>Erro Padrão = 2,38</b>

Nota-se que os efeitos e interações apresentam valores positivos, implicando que o estudo deve prosseguir na direção dos níveis maiores (+1). A razão das somas quadráticas (R<sup>2</sup>) apresentou um valor de 0,9149, demonstrando que 91,49% da variação total em torno da média são explicados pela regressão do modelo proposto.

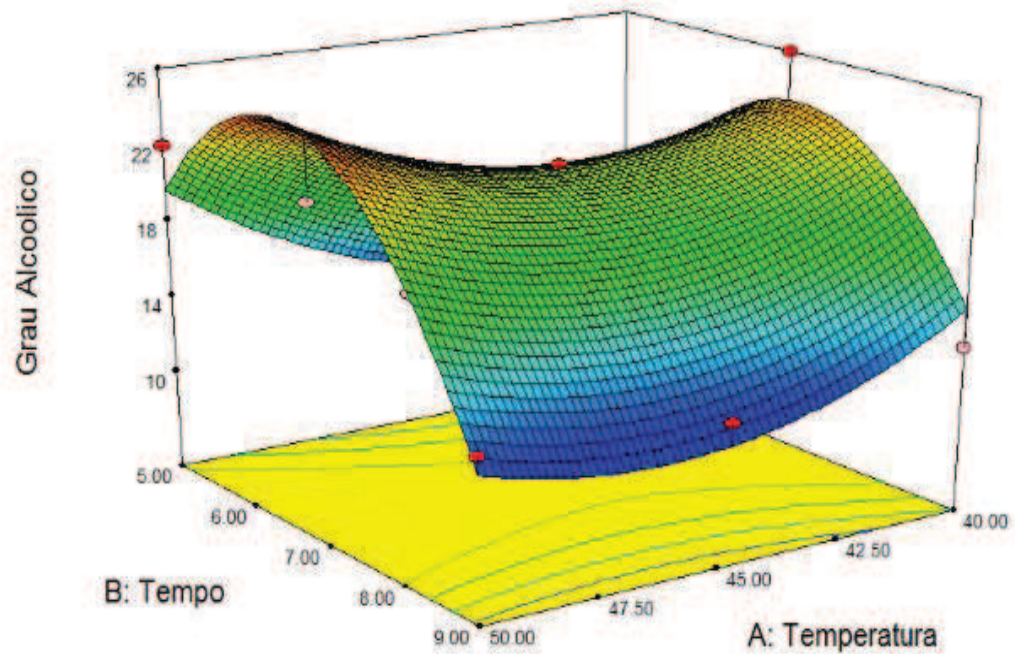
O desvio e o erro padrão para todos os fatores e suas interações foram iguais. Apesar dos valores obtidos serem elevados, este se configurou no modelo em que se obtiveram os maiores valores.

A equação 12 representa o modelo de terceira ordem reduzida, a partir dos efeitos e suas interações apresentadas no delineamento experimental para fatores codificados.

$$GA (\text{°GL}) = 21,34 + (0,78.Y_1) - (1,40.Y_2) - (2,40.Y_1.Y_2) + (2,88.Y_1^2) - (9,07.Y_2^2) \quad (\text{Equação 12})$$

Pela equação 12 observa-se que este modelo, direciona para novos estudos de otimização do processo de hidrólise ácida utilizado, empregando as variáveis: temperatura de hidrólise (Y<sub>1</sub>) e tempo de hidrólise (Y<sub>2</sub>), as quais necessitam de otimização para um rendimento superior.

A figura 34 ilustra a superfície de resposta para o teor de etanol a partir da fermentação da farinha de *Cyperus esculentus*, a partir do planejamento experimental da rota ácida.



**Figura 34** - Superfícies de respostas para o grau de alcoólico em função da  $Y_1$  (temperatura) e  $Y_2$  (tempo reacional) para o ácido nítrico.

Pela figura 34 observa-se uma região onde a hidrólise com o ácido nítrico provoca uma quebra significativa dos polissacarídeos do amido de tiririca, favorecendo a formação de açúcares redutores, resultando em rendimentos de teores alcoólicos maiores.

### 5.3 Análises físico-químicas do etanol de tiririca

#### 5.3.1 Rota enzimática

As análises físico-químicas do etanol obtido foram realizadas nas amostras de maiores rendimentos, segundo as respostas adquiridas no planejamento experimental e na otimização, sendo considerada mais eficiente a concentração de *Saccharomyces cerevisiae* igual a  $15 \text{ gL}^{-1}$  e o tempo de fermentação de 24 h.

Os ensaios de cor e aspecto realizados, demonstraram que o etanol obtido está dentro das especificações, ou seja, apresentou-se incolor, límpido e isento de impurezas..

Para o pH o valor obtido foi 4,70, este baixo valor pode estar associado ao metabolismo do microrganismo, o qual libera  $\text{CO}_{2(g)}$  durante o processo fermentativo e este, na presença de água, poderá formar ácido ao reagir com esta, além da produção de compostos originados pelo metabolismo secundário da levedura e até mesmo decorrente de

possível contaminação do mosto.

O etanol analisado apresentou um valor inferior ao que se enquadra nas especificações exigidas pela ANP, cujo valor previsto está na faixa de pH 6 – 8 (ANP, 2011).

Para a condutividade o valor obtido foi de  $877 \mu\text{Sm}^{-1}$ , este valor elevado da condutividade pode estar associado a presença de íons em solução, provenientes do metabolismo da levedura durante o processo fermentativo. A condutividade também não se enquadra nas especificações exigidas pela ANP, cujo valor máximo  $500 \mu\text{Sm}^{-1}$  (ANP, 2011).

O valor da massa específica igual a  $0,9853 \text{ gcm}^{-3}$ , a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  indica que a densidade do etanol de tiririca está próximo da densidade da água  $1,0 \text{ gcm}^{-3}$ , diferenciando-se da densidade do etanol  $0,7894 \text{ gcm}^{-3}$ .

Como o valor da densidade está diretamente relacionado a mistura água-etanol, este depende da quantidade dessas substâncias. A diferença encontrada pode estar associada a uma quantidade significativa de água na mistura, (destilação e frasco aberto), e também a possíveis impurezas presentes na amostra provenientes do processo de destilação.

### 5.3.2 Rota ácida

Como na rota enzimática, as análises físico-químicas foram realizadas nas amostras de maiores rendimentos, de acordo com as respostas obtidas no planejamento experimental e na otimização, sendo considerado o tempo de hidrólise de 7 min, temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , concentração de levedura igual a  $15 \text{ gL}^{-1}$  e tempo de fermentação de 24 h.

Os ensaios de cor e aspecto realizados apontaram para incolor, aspecto límpido e isento de impurezas, de modo que o etanol obtido encontra-se dentro das especificações.

Para a massa específica o valor encontrado foi igual a  $0,6710 \text{ gcm}^{-3}$ . Por este valor estar relacionado à mistura água-etanol, uma vez que depende da quantidade dessas substâncias, o valor encontrado pode estar agregado a formação de subprodutos, provenientes do processo de destilação.

O valor encontrado para o pH foi igual a 1,62. O baixo valor está atrelado à concentração elevada de ácido utilizado na hidrólise, o que refletiu nos resultados das amostras.

A condutividade apresentou valor elevado igual  $593 \mu\text{Sm}^{-1}$ , o baixo valor determinado pode estar relacionado com o procedimento utilizado, pois para a conversão da molécula de amido em açúcares redutores utilizou-se ácido nítrico  $12 \text{ molL}^{-1}$ , e este por ser portador de

cargas, aumenta a mobilidade dos íons em solução e, conseqüentemente, a condutividade é elevada.

#### 5.4 Estudo de viabilidade econômica hidrólise ácida e enzimática

##### (1ª) EM RELAÇÃO AO PERCENTUAL ALCOÓLICO PRODUZIDO

Os resultados das fermentações com relação aos teores alcoólicos para as duas vias estudadas estão apresentados na tabela 16.

**Tabela 16** - Comparativo dos teores alcoólicos rota ácida e enzimática.

Rota	Grau alcoólico (°GL)
Ácida (HNO <sub>3</sub> )	26,0
Enzimática	29,08

De acordo com a tabela 16 observa-se que os resultados obtidos em termos de teores alcoólicos foram semelhantes. Porém os hidrolisados enzimáticos apresentaram teores alcoólicos superiores em relação aos hidrolisados ácidos. Esse valor está atrelado à eficiência da hidrólise enzimática, pois as enzimas possibilitam a quebra das moléculas de amido de modo específico e seletivo, enquanto que a quebra ácida pode gerar açúcares não fermentáveis, corroborando para uma queda de rendimento real.

A hidrólise enzimática possui eficiências superiores quando comparada à ácida, pelo fato de converter maiores quantidades de glicose. No entanto, o elevado teor de glicose gerado no hidrolisado pode acabar inibindo o metabolismo inicial do microorganismo. A eficiência apresentada por parte das enzimas acarreta em resultado considerável, porém, o custo envolvido no processo enzimático acaba tornando este economicamente oneroso.

## (2ª) EM RELAÇÃO AO CUSTO DE PRODUÇÃO

Para a realização da análise econômica, os cálculos foram realizados visando à obtenção do custo de um ano de cultivo e produção do bioetanol de tiririca, determinou-se então os custos necessários para emprego das variáveis utilizadas nos processos por ambas as rotas, enzimática e ácida, as tabelas 17, 18, 19 e 20 apresentam os cálculos efetuados.

**Tabela 17** - Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para o cultivo de um ano da farinha de tiririca.

Saídas farinha da tiririca	Valor	Unidades	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
<b>I – CUSTOS</b>						
Preparo do solo	1.500,00	R\$/ há	7.500,00	5.000,00	5.000,00	5.000,00
Valor do Arrendamento	1.188,00	R\$/há	1.485,00	1.485,00	1.485,00	1.485,00
Custo de Transporte	60,00	R\$/ ha	300,00	300,00	300,00	300,00
Demanda de Fertilizante	200,00	R\$/ ha	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00
Demanda de Agrotóxicos	-	R\$/ ha	-	-	-	-
Sistema de irrigação/energia	-	R\$/ ha	8.000,00	100,00	100,00	100,00
Demanda de Mão de Obra	864,00	R\$/ ha	7.408,80	7.408,80	7.408,80	7.408,80
Custo da Semente	0	-	-	-	-	-
Moagem	26,58	R\$/t	132,90	132,90	132,90	132,90
<b>SUB-TOTAL I</b>			<b>25.826,70</b>	<b>15.426,70</b>	<b>15.426,70</b>	<b>15.426,70</b>
<b>II – RECEITAS</b>						
Receitas farinha tiririca	Valor	Unidades	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
Venda da farinha valor bruto	0,60	R\$/Kg	36.000,00	36.000,00	36.000,00	36.000,00
Venda de resíduos	0,10	R\$/t	1.500,00	1.500,00	1.500,00	1.500,00
Venda do óleo	1,60	R\$/L	7.200,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00
<b>SUB-TOTAL II</b>			<b>44.700,00</b>	<b>44.700,00</b>	<b>44.700,00</b>	<b>44.700,00</b>
<b>SALDOS</b>						
<b>SALDO (II-I)</b>			<b>18.873,30</b>	<b>29.273,30</b>	<b>29.273,30</b>	<b>29.273,30</b>
<b>SALDO ACUMULADO</b>			<b>18.873,30</b>	<b>48.146,60</b>	<b>77.419,90</b>	<b>106.693,20</b>

(\*) Saldo positivo (crédito) é demonstrado em cor azul e os negativos (débito / custos) em vermelho.

Verifica-se pela tabela 17 que a produção da tiririca para geração de óleo, resíduos e farinha é viável e apresenta lucro ao produtor e fabricante, se não se levar em conta o retorno do capital aplicado para a produção e fabricação dos mesmos.

**Tabela 18** - Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para a produção de um ano do bioetanol de tiririca via rota enzimática.

Produção via rota enzimática de Bioetanol	Unidade R\$/Kg	Unidade R\$/t	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
<b>I – CUSTOS</b>						
Depreciação (imóvel/usina)	0,50	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Farinha	0,15	150,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00
Controle de Qualidade da farinha	0,20	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Hidrólise enzimática (tampão+tempo+enzima+levedura)	62,11	62.110,00	4.658.250,00	1.863.300,00	1.863.300,00	**4.658.250,00
Centrifugação	0,03	30,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00
Adição de N <sub>2(g)</sub>	0,07	70,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00
Fermentação	0,07	70,00	5.250,00	5.25,00	5.250,00	5.250,00
Destilação	0,06	60,00	4.500,00	4.500,00	4.500,00	4.500,00
Controle de Qualidade do Bioetanol	0,01	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Mão de Obra	0,58	580,00	580,00	580,00	580,00	580,00
<b>SUB-TOTAL – I</b>	<b>64,05</b>	<b>63.780,00</b>	<b>4.688.040,00</b>	<b>1.893.0ios90,00</b>	<b>1.893.090,00</b>	<b>4.688.040,00</b>
<b>II- RECEITAS</b>						
Vendas do Bioetanol (R\$/L)	1,28	426,24	31.968,00	31.968,00	31.968,00	31.968,00
Venda do resíduo	0,40	133,20	9.990,00	9.990,00	9.990,00	9.990,00
Venda do óleo (centrifugação)	1,60	1.600,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00
<b>SUB-TOTAL – II</b>	<b>3,28</b>	<b>2.159,44</b>	<b>49.058,00</b>	<b>49.058,00</b>	<b>49.058,00</b>	<b>49.058,00</b>
<b>SALDOS</b>						
<b>SALDO (II - I)</b>			<b>4.638.982,00</b>	<b>1.844.032,00</b>	<b>1.844.032,00</b>	<b>4.638.982,00</b>
<b>SALDO ACUMULADO</b>			<b>4.638.982,00</b>	<b>6.483.014,00</b>	<b>8.327.046,00</b>	<b>12.966.028,00</b>
(*) Saldo positivo (crédito) é demonstrado em cor azul e os negativos (débito / custos) em vermelho;						
(**) A cada 3 trimestres deve ser inserido novos microorganismos no sistema, e o custo voltara a ser elevado.						

Nota-se pela tabela 18 que a produção de bioetanol via rota enzimática da tiririca é inviável economicamente, ressalta-se que haveria a necessidade do Governo Brasileiro inicialmente subsidiar a sua produção, como o intuito de que o aumento da demanda dos microorganismos necessários na hidrólise enzimática diminua os seus custos de produção e revenda, a exemplo do que tem acontecido na atualidade com produção

de bioetanol nos Estados Unidos, com isto haverá minimização dos custos e somente a partir deste processo político pode-se tornar viável a produção deste bioetanol via rota enzimática.

**Tabela 19** - Levantamento econômico-financeiro de receitas e saídas para a produção de um ano do bioetanol de tiririca via rota ácida.

Produção via rota ácida de Bioetanol	Unidade R\$/Kg	Unidade R\$/t	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
<b>I – CUSTOS</b>						
Depreciação (imóvel/usina)	0,50	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Farinha	0,15	150,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00
Controle de Qualidade da farinha	0,20	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Hidrólise ácida (ácido+tempo+levedura)	1,31	1.310,00	98.250,00	68.250,00	68.250,00	**98.250,00
Centrifugação	0,03	30,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00
Adição de N <sub>2(g)</sub>	0,07	70,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00
Fermentação	0,07	70,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00
Destilação	0,06	60,00	4.500,00	4.500,00	4.500,00	4.500,00
Controle de Qualidade do Bioetanol	0,01	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Mão de Obra	0,58	580,00	580,00	580,00	580,00	580,00
<b>SUB-TOTAL – I</b>	<b>2,98</b>	<b>2.980,00</b>	<b>128.040,00</b>	<b>98.040,00</b>	<b>98.040,00</b>	<b>128.040,00</b>
<b>II- RECEITAS</b>						
Vendas do Bioetanol (R\$/L)	1,28	426,24	31.968,00	31.968,00	31.968,00	31.968,00
Venda do resíduo	0,40	400,00	30.000,00	30.000,00	30.000,00	30.000,00
Venda do óleo (centrifugação)	1,60	1.600,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00
<b>SUB-TOTAL - II</b>	<b>3,28</b>	<b>2.426,24</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>
<b>SALDOS</b>						
<b>SALDO (II - I)</b>			<b>58.872,00</b>	<b>28.872,00</b>	<b>28.872,00</b>	<b>58.872,00</b>
<b>SALDO ACUMULADO</b>			<b>58.872,00</b>	<b>87.742,00</b>	<b>116.614,00</b>	<b>175.486,00</b>
(*) Saldo positivo (crédito) é demonstrado em cor azul e os negativos (débito / custos) em vermelho;						
(**) A cada 3 trimestres deve ser inserido novo fermento no sistema, e o custo voltara a ser elevado.						

Observa-se pela tabela 19 que a produção de bioetanol via rota ácida da tiririca é inviável economicamente, porém apresenta um custo (R\$/t) de aproximadamente 95% menor que o processo enzimático. Neste caso em especial o subsídio do Governo Brasileiro inicialmente para a produção deste bioetanol seria menor, e rapidamente (em até três anos) o custo com os reagentes ácidos e de levedura seriam minimizados, com



aumento da demanda dos mesmos industrialmente. Na tabela 20 é projetado futuro desta produção ácida, com minimização dos custos a exemplo da minimização do processo enzimático ocorrido nos Estados Unidos, já citado anteriormente, o qual teve uma redução da ordem de 60% nos reagentes e microorganismos empregados. Outra relevância a ser incluída em pesquisas futuras é o uso de líquidos iônicos no processo o que poderá aumentar o rendimento de produção de bioetanol via rota ácida em até 50% de acordo com literatura (VANCOV et al., 2012).

**Tabela 20** – Projeção econômica financeira para a produção de bioetanol derivado da tiririca via rota ácida, após três anos de subsídio e minimização dos custos.

Produção via rota ácida de Bioetanol	Unidade R\$/Kg	Unidade R\$/t	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
<b>I – CUSTOS</b>						
Depreciação (imóvel/usina)	0,50	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Farinha	0,15	150,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00	11.250,00
Controle de Qualidade da farinha	0,20	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Hidrólise ácida (ácido+tempo+levedura)***	0,53	530,00	39.750,00	30.250,00	30.250,00	**39.750,00
Centrifugação	0,03	30,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00	2.250,00
Adição de N <sub>2(g)</sub>	0,07	70,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00	5.250,00
Fermentação	0,036	36,00	2.700,00	2.700,00	2.700,00	2.700,00
Destilação	0,028	28,00	2.100,00	2.100,00	2.100,00	2.100,00
Controle de Qualidade do Bioetanol	0,01	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Mão de Obra	0,58	580,00	580,00	580,00	580,00	580,00
<b>SUB-TOTAL – I</b>	<b>2,214</b>	<b>2.214,00</b>	<b>64.590,00</b>	<b>55.090,00</b>	<b>55.090,00</b>	<b>64.590,00</b>
<b>II- RECEITAS</b>						
Vendas do Bioetanol (R\$/L)	1,28	426,24	31.968,00	31.968,00	31.968,00	31.968,00
Venda do resíduo	0,40	400,00	30.000,00	30.000,00	30.000,00	30.000,00
Venda do óleo (centrifugação)	1,60	1.600,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00	7.200,00
<b>SUB-TOTAL - II</b>	<b>1,00</b>	<b>2.426,24</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>	<b>69.168,00</b>
<b>SALDOS</b>						
<b>SALDO ( II - I)</b>			<b>4.578,00</b>	<b>14.078,00</b>	<b>14.078,00</b>	<b>4.128,00</b>
<b>SALDO ACUMULADO</b>			<b>4.578,00</b>	<b>18.656,00</b>	<b>32.734,00</b>	<b>37.312,00</b>
(*) Saldo positivo (crédito) é demonstrado em cor azul e os negativos (débito / custos) em vermelho;						
(**) A cada 3 trimestres deve ser inserido nova levedura no sistema, e o custo voltara a ser elevado.						

Os cálculos foram realizados considerando um plantio de 5 ha com rendimento de 15 toneladas de tubérculos por hectare e 10 toneladas de farinha, por trimestre. Foi considerado o ciclo trimestral devido ser este o ciclo de produção da tiririca, podendo ser realizado no ano até quatro colheitas.

Pela tabela 17, observa-se rendimento no plantio, na farinha e na venda dos subprodutos, evidenciando um resultado positivo. O produtor de tiririca poderá desenvolver atividades em vários elos da cadeia produtiva, tais como o plantio e a colheita (elo do cultivo), a moagem dos tubérculos (elo do processamento) e a venda da farinha (elo da comercialização), desta maneira o lucro deste produtor será satisfatório.

De acordo com dados da tabela 18 e 19, pode-se concluir que o processo enzimático para a conversão em açúcares redutores possui um custo elevado de hidrólise, o qual está associado ao tempo de hidrólise apresentado e, principalmente, ao alto custo das enzimas empregadas no processo, o que acaba levando à sua inviabilização.

Todavia, apesar do custo aplicado ao processo de obtenção do hidrolisado a partir da rota ácida ser inferior ao enzimático, o processo também é inviável economicamente, entretanto se este receber subsídio do Governo, os custos minimizam, viabilizando este processo é importante salientar que se faz necessária à neutralização do mesmo, para que não aconteça à corrosão dos equipamentos utilizados no procedimento.

## 5.5 Análise social

O cultivo da tiririca poderá ser uma alternativa para o agronegócio Brasileiro, pois a cadeia produtiva viabiliza o emprego do elo do cultivo, plantio e colheita, do elo do processamento, extração do óleo e produção de etanol e finalmente do elo da distribuição/comercialização e venda do farelo. Desta forma, o produtor poderá alcançar um lucro considerável (GALLINA, 2011).

A tiririca é considerada uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol por apresentar um ciclo de quatro vezes ao ano, não haver a necessidade de um grande preparo do solo e de maquinários específicos para o seu cultivo, por este ser isento de uso de agrotóxicos e pelo seu plantio e colheita envolverem um número significativo de pessoas, tendo em vista que pode ser cultivada em praticamente todos os tipos de solo, não existindo a necessidade dos terrenos usados serem planos ou possuírem boas condições. Isto viabiliza o acesso à agricultura familiar, possibilitando ampliação na distribuição de renda.

Se compararmos com o rendimento por tonelada de outra matéria-prima amilácea, como a mandioca, esta acaba superando a tiririca em termos de produção por apresentar um valor de 24,8 toneladas/ha, produzindo aproximadamente 2589L/ha (OLIVEIRA; SERRA; MAGALHÃES, 2012). Já a tiririca produz 15 toneladas de tubérculos/ha, com um volume de etanol em torno de 2000L/ha. No entanto, no que se refere ao custo de produção agrícola, a mandioca supera a tiririca por necessitar de um gasto mais elevado para seu cultivo. E ainda, a mandioca faz parte da base alimentar da maioria da população de baixa renda, enquanto que a *Cyperus esculentus* não faz parte da cadeia alimentar humana.

## 5.6 Análise ambiental

Os principais fatores que podem subsidiar o plantio da tiririca são as suas vantagens ambientais, pois para este, como já citado anteriormente, não há a necessidade de adição de agrotóxicos durante o seu plantio, minimizando-se assim os problemas de ordem ambiental como a contaminação de solos, rios e lençóis freáticos.

A colheita manual dispensa o uso de maquinários, que utilizam combustíveis fósseis para seu movimento, o que contribui para a redução da exaustão de gases tóxicos na atmosfera.

De uma forma geral, a política Brasileira tem incentivado a busca de alternativas viáveis economicamente, ambiental e social, e o uso da farinha da tiririca para a produção de etanol poderá ser esta alternativa. Porém, deve-se considerar a existência de uma possível barreira cultural no momento em que se der a apresentação desta proposta aos agricultores, mas deve ser lembrado também que, como a tiririca, a soja, uma das matérias-primas empregadas em larga escala para a produção de biodiesel, antigamente já foi conhecida como uma erva daninha e atualmente sua comercialização envolve altos valores. A soma destas vantagens apresentadas neste trabalho ressalta a sustentabilidade de todo o processo de obtenção do etanol a partir do uso de uma erva daninha como a *Cyperus esculentus*.

Cabe ressaltar ainda que a produção de etanol derivado da tiririca necessitará contar com incentivos fiscais e políticos governamentais, bem como da promoção de inovações tecnológicas a serem desenvolvidas, contemplando-se todos os princípios de sustentabilidade, isto é, social, ambiental, econômica, política e de inovação tecnológica.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível produzir etanol a partir da farinha da erva daninha *Cyperus esculentus*;
- ✓ A melhor concentração de *Saccharomyces cerevisiae* foi de 15 g.L<sup>-1</sup> com o tempo de fermentação de 24 horas, rendendo 29,08 % de etanol via rota enzimática e 26,0 % via rota ácida;
- ✓ Os teores alcoólicos encontrados 26,0 % e 29,08 % respectivamente para a rota ácida e enzimática demonstram que a rota enzimática é 1,12 vezes mais eficiente que a ácida;
- ✓ A análise econômica sugere que a produção de etanol a partir da *Cyperus esculentus* é inviável utilizando-se a rota ácida ou enzimática;
- ✓ O processo via rota ácida apresenta um custo menor do que a rota enzimática, e caso se tenha um subsídio do governo, a produção pela rota ácida pode-se tornar viável;
- ✓ Os estudos demonstraram viabilidade econômica no processo de geração de óleo para a produção de biocombustível, farinha e resíduo a partir da tiririca, colaborando positivamente com os aspectos sociais e ambientais.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a composição geral do hidrolisado visando a complementação nutricional do mosto e, conseqüentemente, seu enriquecimento e melhores rendimentos de fermentação;
- Avaliar a composição química da farinha de tiririca;
- Avaliar a composição química do destilado produzido;
- Analisar a influência da toxicidade do etanol na levedura;
- Realizar estudo de inibição pela quantidade de açúcar e quantidade de etanol;
- Realizar estudo cinético com uso de modelos da literatura.
- Estudar o uso de líquidos iônicos via rota ácida, o qual poderá aumentar o rendimento de produção de bioetanol;
- Estudar geneticamente a produção da tiririca para torná-la uma planta cultivável.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3 ed. Darmstadt: Wiley-vch, p. 516, 2007.

ALLEY, R. et al. *Mudança do Clima 2007: a Base das Ciências Físicas. Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima*. Geneva, 2007. Disponível em: <[http://www.natbrasil.org.br/docs/ipcc\\_2007.pdf](http://www.natbrasil.org.br/docs/ipcc_2007.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2012.

AMARAL, L. I. V. do, et al.. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, v. 34. p. 425–431, 2007. Disponível em: <<http://www.ibot.sp.gov.br/publicacoes/hoehnea/vol34/Hoehnea34%284%29artigo01.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

ANDRIETA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETA, M. G. S. Bioetanol-Brasil, 30 anos de vanguarda. *MultiCiência* 7, Universidade de Campinas, São Paulo, out. 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_02\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf)>. Acesso em: 16 fev. 2013.

Agência Nacional do Petróleo – ANP. Gás Natural e Biocombustíveis. *Biocombustíveis*, Brasília, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso: 12 jan. 2012.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZANI, W. Alimentos e bebidas obtidos por fermentação. *Biotecnologia*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 5. p. 243, 1983.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. *Biotecnologia*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 3. p.1-43, 2001.

ARAÚJO, C. E. F. Diagnóstico da situação atual do bioetanol no Brasil: impactos socioambientais e novos desafios para as políticas públicas. *IV ENANPPAS*, Brasília: ANPPAS, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. Turkey, jan. p. 551-573, 2008.

BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology*, v. 26, n. 1, p. 89 – 105, 2008.

Balanço energético nacional Ministério de Minas e Energia. *BEN*. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2\\_-\\_BEN\\_-\\_Ano\\_Base/1\\_-\\_BEN\\_Portugues\\_-\\_Inglxs\\_-\\_Completo.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2_-_BEN_-_Ano_Base/1_-_BEN_Portugues_-_Inglxs_-_Completo.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Unicamp, 1995.

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

BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. 2001. Disponível em: <[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/.../tde-28092001.../Belluco.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/.../tde-28092001.../Belluco.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2012.

BENINCA, C. Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. **Dissertação de Mestrado**. 2008. Disponível em: <[http://www.bicentede.uepg.br/tde\\_arquivos/7/TDE-2008-09-22T140930Z-203/Publico/Cleoci%20Beninca.pdf](http://www.bicentede.uepg.br/tde_arquivos/7/TDE-2008-09-22T140930Z-203/Publico/Cleoci%20Beninca.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2012.

**BIODIESELBR.** Biodiesel. São Paulo. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>>. Acesso em: 06 jul. 2012.

**BIODIESELBR.** 30 anos de Proálcool. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/30-anos/proalcool-30-anos.htm>>. Acesso em 06 jul. 2012.

**BIOENERGIA:** Manual sobre tecnologias, projetos e instalações. Disponível em: <[http://www.moretti.agrarias.ufpr.br/eletrificacao\\_rural/livro\\_bioenergia\\_manual\\_sobre%20tecnologias\\_projetos\\_e\\_instalacoes\\_2004.pdf](http://www.moretti.agrarias.ufpr.br/eletrificacao_rural/livro_bioenergia_manual_sobre%20tecnologias_projetos_e_instalacoes_2004.pdf)>. Acesso em: 08 jul. 2012.

BLANCHARD, P. H.; KATZ, F. R. Starch Hydrolysates. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and their Application**. New York: Marcel dekker, p. 99, 1995.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A.. Introdução à química de alimentos. 3 ed. São Paulo: Varela, p. 169 , 2003.

BORJESSON, P. I. I. Energy analysis of biomass production and transportation. **Biomass and Bioenergy**, Great Britain, v. 11, n. 4, p. 305-318, 1996. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/0961953496000244/1s2.00961953496000244main.pdf?\\_tid=3cc2dcd20740c2dfc6e884a0b758e63c&acdnat=1341616689\\_44a356a1321d3c6d4db4df25fb2bec18](http://ac.els-cdn.com/0961953496000244/1s2.00961953496000244main.pdf?_tid=3cc2dcd20740c2dfc6e884a0b758e63c&acdnat=1341616689_44a356a1321d3c6d4db4df25fb2bec18)>. Acesso em: 06 jul. 2012.

BORSATO, D.; GALÃO, F. O.; MOREIRA, I. **Combustíveis Fósseis: Carvão e Petróleo**. Londrina: Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 169, 2005.

BRAMBILLA, E. M. Obtenção do amido de milho através da moagem via úmida e seus diferentes tipos de modificação química. 2001, 126f. **Monografia** (Conclusão de curso superior). Universidade do Norte do Paraná, Arapongas, 2001.

BRASIL, Resolução nº 12, de 1987. Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos – CNNPA/ANVISA – **Agência Nacional da Vigilância Sanitária**. Normas técnicas especiais. São Paulo, 1978. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf)>. Acesso em 10 de set. 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia. **Açúcar e Álcool no Brasil**. Brasília (DF): Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/alcool\\_acucar\\_no\\_brasil\\_mapa\\_000fl6j9ex702wyiv80isprrqr3jqt.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/alcool_acucar_no_brasil_mapa_000fl6j9ex702wyiv80isprrqr3jqt.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2012.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopeia Brasileira. 4 ed. Fascículo 1 (Amido). 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

CABELLO, C. Matérias-primas amiláceas para fins energéticos. In: V Workshop sobre Tecnologias em Agroindústrias de Tuberosas Tropicais. Centro de Raízes e Amidos Tropicais (VERAT). Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2007.

CARDOSO, G. B. C. Aplicação de dessecante na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para colheita mecanizada. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. 2011. Disponível em: <[www.teses.usp.br/teses/.../11/.../Gilda\\_Brasil\\_Camargo\\_Cardoso.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/.../11/.../Gilda_Brasil_Camargo_Cardoso.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2012.

CARDOSO e SOUZA, A. F. B. Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol. Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins. **Dissertação de mestrado**. 2005. Disponível em: <[http://www.site.uft.edu.br/component/option,com\\_docman/task,doc\\_download/gid,906/](http://www.site.uft.edu.br/component/option,com_docman/task,doc_download/gid,906/)>. Acesso em: 12 jan. 2012.

CARVALHO, R. V. de, et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. E hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 2, p. 380 – 386, 2008.

CASTRO, M. 30 anos de Proálcool. **Biodieselbr.com**. 2005 Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/30-anos/proalcool-30-anos.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

**CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA (CENBIO). SUSTENTABILIDADE**. Disponível em: <<http://cenbio.iee.usp.br/saibamais/sustentabilidade.htm>>. Acesso em 11 jan. 2012.

CEREDA, M.P.; FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido. São Paulo, Campinas: Fundação Cargill, v.1, p. 101-133, 2001.

CEREDA, M. P.; CAETÂNEO, A.. Avaliação de Parâmetros de qualidade de fécula fermentada de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**. Bahia, Cruz das Almas. v. 5, n. 2, p. 55 –62, 1986.



CEREDA, M. P. Amidos Modificados. **Bol. SBCTA**. n. 30, v. 1, p. 31-36, 1996.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Propriedades gerais do amido. São Paulo: Fundação Cargill. v.1, cap.6, p.530-575, 2003.

**Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB)**. 1º Inventário Nacional de emissões atmosféricas por veículos automotores rodoviários, 2011. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/163/\\_publicacao/163\\_publicacao27072011055200.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/163/_publicacao/163_publicacao27072011055200.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2014.

COLETTI, R.A. Biodiesel: Combustível Renovável e Ambientalmente Correto. **Revista Biodieselbr**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 21-25, 2005. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/destaques/2005/combustivel-renovavel.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

**Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)**. Acompanhamento da Safra Brasileira 2013/2014, 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_08\\_09\\_39\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2013.

COSTA, M. R. Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias-primas amiláceas visando a obtenção de etanol. Maceio, Alagoas. **Dissertação de mestrado**. 2010. Disponível em: <[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_maryluce\\_rabelo\\_costa.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_maryluce_rabelo_costa.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2013.

DAMASCENO, C. M. B. et al. A importância da Lignina para a produção de etanol de segunda geração. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Minas Gerais, dezembro. 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884400/1/doc108.pdf>>. Acesso em: 07 mar. 2013.

DEMIATE, I. M.; WOSIACK, G., CZELUSNIAK, C., NOGUEIRA, A., Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Totulométrico. PUBLICAÇÃO UEPG, Ciências Exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias. v. 8, p. 65 – 78, 2002.

DENARDIN, C.C. Influência do Teor de Amilose e Beneficiamento do Arroz na Resposta Biológica de Ratos. **Dissertação de Mestrado**. Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2008.

EDUARDO, M. P. Hidrólise enzimática de mandioca e pupa para obtenção de xarope de maltose. São Paulo, Piracicaba. **Dissertação de Mestrado** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz. 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-07042003-142026/pt-br.php>>. Acesso em: 07 mar. 2013.

ESPINOSA, M. M. Desenvolvimento de um modelo estatístico para aplicação no estudo da fadiga em emendas dentadas de madeira. **Tese de Doutorado**. 2001. São Paulo, São Carlos.

FAPESP; Um futuro com energia sustentável: iluminando o caminho. **InterAcademyCouncil Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo: Academia Brasileira de Ciências, p. 300, 2010.

FELTRAN; J.C., VALLE; T. L., Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam): Matéria-prima alternativa para a produção de etanol. 2009.

FENNEMA, O. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acríbia, p. 1258, 2000.

FERREIRA, G. B.; MELO, V. V. de; ALMEIDA, J. B. O. de; EVANGELISTA, A. F.; SOUZA, R. R. de. Caracterização do Processo de Obtenção de Uma Aguardente de Mandioca, **Brasilian Journal of Food Technology**, 5º SIPAL, mar, 2005. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos//brazilianjournal/ed\\_especial/02.pdf](http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos//brazilianjournal/ed_especial/02.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2013.

FIGUEIREDO, C. B.; FILHO, J. R. F. Os impactos sociais dos biocombustíveis. **V Congresso Nacional de Excelência em Gestão: Gestão do Conhecimento para a Sustentabilidade**. Niterói, Rio de Janeiro. Julho. 2009. Disponível em: <[http://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg5/anais/T8\\_0151\\_0798.pdf](http://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg5/anais/T8_0151_0798.pdf)> Acesso em: 12 jul. 2012.

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades gerais do amido. Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo, Campinas: Fundação Cargill. v.1, p. 224, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000182&pid=S0101-2061200800030001800014&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000182&pid=S0101-2061200800030001800014&lng=es)>. Acesso em: 10 jun. 2012.

FRANCO, C.M.L. Contribuição ao estudo da estrutura do amido. Universidade Estadual Paulista, p. 108, 2004.

FREITAS, A. A. de; KWIATKOWSKI, A.; TANAMATI, A. A. C.; FUCHS, R. H. B. Uso de farinhas de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) cv Monalisa em misturas para cobertura de empanados de frango. Ciências Exatas Terra, Ciências Agrícolas e Engenharia, Ponta Grossa, v. 11, n. 2, p. 17-26, 2005.

GALLINA, A. L. Uma alternativa sustentável para a produção de biodiesel: *Cyperus esculentus*. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná. **Dissertação de Mestrado**. 2011.

GALLINA, A.L.; RODRIGUES, P.R.P.; STROPARO, E. C.; CUNHA, M. T. A Corrosão do aço inoxidável austenítico 304 em biodiesel. **Revista de Minas**. v. 63, n. 1, p. 71-75, 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=56416597012>>. Acesso em: 18 jul. 2013.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2009/vol32n3/03-QN08645.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

GONCALVES, F. M. V.; SARMENTO, S. B. S.; DIAS, S. T. dos S.; MARQUENIZI, N. Tratamento térmico do amido de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) sob baixa umidade em

micro-ondas. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*. São Paulo, Campinas. v. 29. p. 270-276, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. de; SOUTO-MAIOR, A. M; ROCHA, G. J. de M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, Pernambuco, Recife, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/26.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

GOULD, B. J. *Enzyme Biotechnology*, Chichester, A. Wiseman: Ellis Horwood Ltda, 1975.

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

HUBBARD, M.. R. *Statistical quality control for the food industry: Design of Experiments*. 3 ed. New York: Kluwer Academic. cap. 12, p. 232-252.

IAL, Instituto Adolfo Lutz, Normas Analíticas. Métodos Químicos e Físicos para a Análise de Alimentos. Sao Paulo, IAL, 1976.

**INTERNATIOAL ENERGY AGENCY (IEA)**. The energy situation in brazil: an overview. May. 2006. Disponível em: <<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/brazil-1.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2012.

JANK, M. S. Álcool , Açúcar e Bioenergia. Impasse compromete futuro do etanol. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 19 dez. 2011. Disponível em: < <http://www.sindalcool.com.br>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

KEARSLEY, M. W.; DZIEDZIC, S. Z. *Handbook of starch hydrolysis product sandtheir derivatives*. Blackie Academic& Professional, Glasgow. p. 275, 1995. ISBN 0751402699.

KUVA, M. A. et. al. Períodos de Interferência da Plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. I – Tiririca. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 18, n. 2, p. 241-251, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pd/v18n2/05.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

LACERDA, L.G. Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais. Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa – PR. **Dissertação de mestrado**. 2006. Disponível em: <<http://www.uepg.br/mestrados/mescta/Arquivos/Dissertacoes/LACERDA,%20LG.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2013.

LACHEFSKY, K.; TEIXIERA, W. G. T. Energia **AGRONEGÓCIO + AGROENERGIA**: Impactos Cumulativos e Tendências Territoriais da Expansão das Monoculturas para a Produção de Bioenergia, 2006.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. *Carboidratos em alimentos regionales ibiroamericanos*. São Paulo: Universidade de São Paulo, p.648, 2006.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier. p. 781, 1995.

LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. O Biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, São Paulo, v. 78, p. 15-21, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010133002007000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010133002007000200003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 08 jul. 2012.

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

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.1, v.22, p.65-69, 2002.

LIMA, U. A. et al. (Coord.) Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. **Aguardentes**, São Paulo, Edgard Blücher, v. 4, p. 145 – 182, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. **Biotecnologia**, São Paulo, Edgard Blücher, 1975.

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

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil; terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum. 2 ed, p. 150-157, 2000.

MANEK, R. V. et al. Physicochemical and Binder Properties of Starch Obtained from *Cyperus esculentus*. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 2, junho. 2012. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

Ministério da Agricultura e Pecuária. Portaria **MAPA** n° 105 DOU 1/3/2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

Ministério de Minas e Energia, **MME**, 2013. Disponível em: <[http://www.forumdeenergia.com.br/nukleo/pub/sintese\\_do\\_relatorio\\_final\\_2013\\_web.pdf](http://www.forumdeenergia.com.br/nukleo/pub/sintese_do_relatorio_final_2013_web.pdf)>. Acesso em: 26 nov. 2013.

MATOS, F. J. A.; CAVALCANTI, F. S.; PARENTE, J. P. Estudo agrônomo qualitativo e quantitativo de *Cyperus esculentus* L. (junça) - uma fonte inexplorada de alimento energético. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 124-129, jan./mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/35/33>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

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

MOREHOUSE, A.L.; MALZAKS, R.C.; DAY, J.T. **U.S. Patent 3.663.369**, Grain processing Co. 1972.

NIBA, L. HUI, Y. H. Handbook of food Science, technology, and engineering: Carbohydrates – Starch. **Food Science and Technology**. Boca Ration: CRC Press. cap. 1, p. 1-23, 2005.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, A.J.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.; CESAR, M.A.A.; VALSECCHI, O. I curso de extensão em tecnologia de aguardentes (apontamentos). São Paulo, Piracicaba: ESALQ/USP. Deptº. de Tecnologia rural, p. 104, 1974.

OATES, C. G. Towards An Understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.11, p.375-382, 1997.

OBERLING, D.F. Avaliação ambiental estratégica da expansão de etanol no Brasil: Uma proposta metodológica e sua aplicação preliminar. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro – RJ. **Dissertação de mestrado**. 2008. Disponível em: <<http://www.climaenergia.ppe.ufrj.br/ppp/production/tesis/danieloberling.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2012.

OLADELE, A.K.; AINA, J.O. Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tigernut (*Cyperus esculentus*). **African Journal of Biotechnology**. v. 6 p. 2473-2476, 2007. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58100/46464>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. Biodiesel: Possibilidades e Desafio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 28, p. 3-8, mai. 2008. Disponível em:<<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/02-QS-1707.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

OLIVEIRA, L. M.; SERRA, J. C. V.; MAGALHÃES, K. B. Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **GEOAMBIENTE ON-LINE**. Goiás, Jataí, n. 19, 2012. Disponível em: <[http://revistas.jatai.ufg.br/index.php/geoambiente/article/view/1480#Uw395s40\\_zg](http://revistas.jatai.ufg.br/index.php/geoambiente/article/view/1480#Uw395s40_zg)>. Acesso em 23 out. 2013.

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

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

PASSOS, M. Valorização biotecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. 2002. 150f. **Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PATARO, C. et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in na cachaça distillery. **Revista Microbiológica**, v.29, p. 69 –79. 1998.

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

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S.; **Microbiologia**, v.1, São Paulo: McGraw, 1980.

PERONI, F. H. G. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas. **Dissertação de Mestrado**–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Paulo, São José do Rio Preto, 2003.

PIMENTEL, D., PATZEK, T. W., Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. **Natural Resources Research**, v. 14, n. 1, p. 56 – 76, 2005.

POLAKOVIC, M.; BRYJAK, J. Modelling os potato starch saccharification by na *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochemical Engineering Journal*, Bratislava, p. 57 – 63, 2003.

REED, G. *Enzymes in Food Processing*. 2ed. New York: Academic Press Inc, p. 62-87, 1975.

REGULY, J. C. *Biotechnologia dos processos fermentativos: Produção de enzimas e engenharia das fermentações*. Pelotas, Universitária UFPEL, v. 3, p. 205, 2000.

RIBEIRO, R. A. et al. Vida útil e metabolismo de carboidratos em raízes de mandiocinha-salsa sob refrigeração e filme PVC. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 453-458, abr. 2007.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/pab/v42n4/01.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

ROSAS, J. *Curso de Biología Molecular Y Celular. Enzimas: Aceleradores de lãs Reacciones Químicas de los Seres Vivos*, 2003. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>> Acesso em: 20 Out. 2012.

RUSSELL, I. c. In: (Ed.). *THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: UK: Nottingham University Press, 2003. *Understanding Yeast Fundamentals*.

SALLA, D. A. et al. Estudo energético da produção de biocombustível a partir do milho. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, n. 9, p. 2017-2022, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n9/a704cr2743.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2012.

SANTOS, D. N.; NEVES, G. N.; BRANCO, R. N. C. **Espectroscopia na região do ultravioleta/visível**. Universidade Federal do Pará. Trabalho apresentado à disciplina Elementos de Instrumentação Científica, Belém, Pará. 2010. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/53575282/Espectroscopia-na-Regiao-do-UV-VIS>> Acesso em: 07 mar. 2013.

SEBRAE BAHIA. *Mandiocultura: derivados da mandioca*/Integra Consultoria e Representação e Comercio. Bahia, Salvador p. 18, 2009. Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/FAE92C370E44479B8325766300576F62/\\$File/NT00042B7E.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/FAE92C370E44479B8325766300576F62/$File/NT00042B7E.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2014.



SERVINO, L. S. et al. Hidrólise enzimática do amido da batata doce. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 7, n. Especial, p. 316-323, jul./dez. 2011. Disponível em: <<http://www.unoeste.br/site/pos/enapi/2011/suplementos/documentos/Agrariae-PDF/CDProdSucro.pdf#page=25>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**. v. 34, n. 2, p. 247 – 251, 2001.

SCIPIONI, G. C., Otimização do processo fermentativo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum L.*) utilizando enzimas amilolíticas. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em engenharia de processos. Universidade Estadual de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.

SILVA, R. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, set./dez. 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612003000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000300007)> Acesso em: 06 jul. 2012.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, maio./jun. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n3/a44v38n3.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

SILVA, G. S. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, São Paulo. **Trabalho de Graduação**. 2010. Disponível em: <<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020012.pdf>> Acesso em: 11 jan. 2012.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel- ethanol fermentation process assessed by PCR- fingerprinting, p. 13-23, 2005.

SILVEIRA, M. A.; Batata-doce: Uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. Álcool Combustível - **Série Indústria em Perspectiva**. Brasília, v. 1, p. 109-122, 2008.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SINGH SODHI, N. e SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**. v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOLOMONS, G., Química Organica. Ed. McGraw-Hill, 1999.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p.205-218, 2003.

SOUTO, B. M.; QUIRINO, B. A Metagenômica na Prospecção de Enzimas para Etanol celulósico. **Embrapa**: Imprensa, Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/a-metagenomica-na-prospeccao-de-enzimas-para-etanol-celulosico-1/>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

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

STROPARO, E. C. Avaliação do processo de hidrólise da batata doce por enzimas comerciais e por enzimas produzidas por *a. niger* em condições otimizadas. **Dissertação de Mestrado**. UNICENTRO, Guarapuava, Pr 2011. Disponível em: <[http://www.unicentro.br/posgraduacao/mestrado/bioenergia/dissertacoes/Disserta\\_o\\_Erivelt on\\_Stroparo\\_514364b54d0d9.pdf](http://www.unicentro.br/posgraduacao/mestrado/bioenergia/dissertacoes/Disserta_o_Erivelt on_Stroparo_514364b54d0d9.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2013.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P. Hidrólise do amido. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v. 3, cap. 15, p. 530-575, 2003.

TAVARES, J. T. de Q.; CARDOSO, R. L.; COSTA, J. A.; FADIGAS, F. de S.; FONSECA, A. A. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**. v. 33, n. 04, p. 805 – 809, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n4/08.pdf>>. Acesso em: 05 jun 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao.htm>>. Acesso em 10 out. 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Produção do etanol brasileiro. 2012. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/sid/18797613/>>. Acesso em: 16 dez.2013.

VACLAVIK, V.A.; CHRISTIAN, E.W. Essentials of Food Science: Starches in Food. 3.ed. Texas (US): Springer, 2008. Cap. 4,p. 49-67. (Food Science Text Series).

VANCOV, T.; ALSTON, A-S., BROWN, T.; MCINTOSH, S. **Renewable Energy**. v. 45, p.1-6, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148112001875>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H. e DIJKHUIZEN, L. Properties And Applications Of Starch-converting enzymes of the Î±-amilase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, n.2, p.137-155. 2002.

VAN DIJKEN, J. P. e SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v.32, n.3-4, p.199-224. 1986.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.;SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum filmes: Effect of additive sand deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 341, 2005.



VIEIRA, F. Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), de batata doce (*Ipomoea batatas*) e de gengibre (*Zingiberofficinale*). 2004. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

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

YAN, S. et al. Fed Batch Enzymatic Saccharification of Food Waste Improves the Sugar Concentration in the Hydrolysates and Eventually the Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* H058. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**, Curitiba, v. 55, n. 2, p. 183-192, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132012000200002&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132012000200002&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 06 jul. 2012.

ZHANG, Q-H. et al. A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 635-641, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410003560>>. Acesso em: 06 jul. 2012.

## APÊNDICE I

---

Os cálculos de saídas e receitas referente à produção da farinha de tiririca (tabela 17), foram realizados em relação a 5 hectares de terra com rendimento de 15 toneladas de tubérculos por hectare e 10 toneladas de farinha, produzindo aproximadamente 2000 L. Para melhor compreensão dos cálculos, estes estão descritos abaixo:

- ✓ Preparo do solo: visa a melhoria das condições físicas e químicas para garantir a brotação, o crescimento radicular e o estabelecimento da cultura. Neste valor está contido o custo do preparo da terra (arar e gradear);
- ✓ Valor do Arrendamento: neste item foi realizada consulta a produtores rurais e arrendatários da região de Guarapuava, o valor médio é de 18 sacas de soja /hectare/ano sendo o valor da saca de soja em torno de R\$ 66,00, assim foi calculado o valor do arrendamento para 5 hectares durante 12 meses;
- ✓ Custo de Transporte: este item está relacionado ao gasto de combustível para a colheita e o transporte até o galpão para guardar os rizomas;
- ✓ Demanda de Fertilizante: estes valores são os mesmos utilizados para uma lavoura de batata inglesa, devido a semelhança entre as culturas;
- ✓ Demanda de Agrotóxico: não existe um valor, devido aos agrotóxicos serem usados para controle de pragas, no caso como a tiririca é uma erva daninha este passo é desnecessário;
- ✓ Sistema de Irrigação e Energia: neste item foi considerado para o primeiro trimestre o custo de se implantar um sistema de irrigação e nos trimestres posteriores somente o custo com a energia para manter esse sistema funcionando;
- ✓ Demanda de Mão de Obra: consideraram-se o número de 4 funcionários, trabalhando 8 horas por dia e recebendo um salário mínimo por mês;
- ✓ Custo de semente: devido esta planta não precisar de um plantio de semente e sim dos tubérculos que podem ser encontrados em qualquer terreno foi considerado custo zero;
- ✓ Moagem: esta etapa é para a obtenção da farinha dos tubérculos, o custo deste processo é cerca de R\$ 26,58/t, já considerando salário do operador da máquina;
- ✓ Venda da farinha: foi utilizado o valor por Kg de farinha;
- ✓ Venda de sub-produtos: como a composição do farelo da tiririca tem o mesmo destino do farelo de soja, o valor por ha foi considerado o mesmo. O óleo foi considerado a venda por litro;
- ✓ Investimento/Financiamento: não foi considerada nenhuma maneira de injeção de dinheiro no sistema devido a um agricultor já ter tudo o que é necessário para o plantio;

Já para a tabela 18 e 19 de saídas e receitas da produção de bioetanol de tiririca foi levado em consideração:

- ✓ Depreciação (imóvel/usina): neste item foi considerado que para uma usina de produção de biodiesel que custe em torno de 500 reais, com um índice de depreciação de 1%/ano.
  - ✓ Farinha: valor pago ao produtor de farinha de tiririca;
  - ✓ Controle de qualidade da farinha: valor gasto para realizar análise da farinha por uma empresa terceirizada;
  - ✓ Hidrólise enzimática: foi utilizado como base de cálculo uma tonelada, o tempo de hidrólise, solução tampão de McIlvaine, enzimas (alfa-amilase e amiloglucosidase) e levedura *Saccharomyces Cerevisiae* necessárias para o processo enzimático;
  - ✓ Hidrólise ácida: valor calculado em relação ao tempo de hidrólise, ácido nítrico e levedura *Saccharomyces Cerevisiae* necessário para o processo;
  - ✓ Centrifugação: quantidade de energia gasta para uma tonelada, considerando o preço do kWh igual R\$ 0,29870;
  - ✓ Nitrogênio: quantidade de nitrogênio necessário para uma tonelada;
  - ✓ Fermentação: gasto energético necessário para proceder a fermentação de uma tonelada;
  - ✓ Destilação: gasto energético necessário para destilar o mosto;
  - ✓ Controle de qualidade do bioetanol: valor necessário para realizar análise do bioetanol produzido, visando a garantia da qualidade deste;
  - ✓ Mão de obra: foi calculado o custo para manter 4 trabalhadores, considerando o salário mínimo;
  - ✓ Venda do bioetanol (usina): considerando a produção por meio da agricultura familiar, este poderá então receber um selo, assim poderá ser vendido a 1,28/L (UNICA, 2011);
  - ✓ Vendas do resíduo: valor pago a resíduos oriundos do processo de destilação.
-

## Anexo 1 – Curriculum Vitae – Simone Cristina Loures Pereira

---

### Dados Pessoais

Nome: Simone Cristina Loures Pereira

Nascimento: 10/04/1980 – Guarapuava/Pr – Brasil

---

### Formação Acadêmica/Titulação

2012-2014: Mestrado em Bioenergia.

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava/Pr, Brasil.

Título: Estudo comparativo de álcool utilizando a *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida.

2006-2007: Especialização.

Instituto de Estudos Avançados e Pós-Graduação – ESAP.

Título: Educação e Gestão Ambiental

1999-2002: Graduação em Química Licenciatura e Bacharelado.

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava/Pr, Brasil.

---

### Produção Bibliográfica

Trabalho publicado em anais e eventos

1 - Trabalho apresentado no I Congresso do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais da Unicentro – I CONSEAG, com o título “Produção de Biocombustíveis, Biodiesel e Etanol empregando a planta daninha *Cyperus esculentus*”, novembro de 2012.

Participação em Bancas

1 - Abordando o tema Drogas na disciplina de Química na Graduação do Ensino Médio, através da Metodologia de Ensino, 2012.

2 - Estudo da hidrólise ácida da erva daninha *Cyperus esculentus* visando a obtenção de etanol, 2013.

3 - Artigo publicado na Revista Ambiência (Online). Produção de Biocombustíveis, Biodiesel e Etanol empregando a planta daninha *Cyperus esculentus*, v. único, p. 309-312, 2013.