

**EVELINE GHELLER DOS SANTOS**



**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE BATATA-DOCE  
COM VARIAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO**

**GUARAPUAVA - PR**

**2015**

**EVELINE GHELLER DOS SANTOS**

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE BATATA-DOCE COM VARIAÇÕES NAS  
CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO**

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.

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende  
Orientador

Prof. Dr. Edson Perez Guerra  
Co-Orientador

GUARAPUAVA - PR  
2015

*Aos meus pais e irmão, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e tudo de bom que sempre fez por mim, pelo caminho traçado!

A minha família, por sempre estar presente em todos os momentos, fossem os de glória ou fracasso!

Ao meu orientador Professor Doutor Juliano T. V. de Resende e ao co-orientador Professor Doutor Edson Perez Guerra.

A Professora Doutora Katielle R. V. Córdova por todo auxílio e disponibilidade, que me foram de imensurável valia.

A Fabielli Oliveira pela ajuda e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Grupo de Pesquisa em Olericultura da Unicentro.

Aos meus amigos, pela amizade e companheirismo nessa difícil jornada, obrigada!

A Universidade Estadual do Centro-Oeste e ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia pela oportunidade de cursar o mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser,  
mas graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Martin Luther King

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	v
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Matriz energética .....	4
3.1.1. Etanol .....	6
3.2. Batata-doce .....	8
3.3. Açúcares .....	9
3.4. Amido .....	10
3.4.1. Hidrólise.....	11
3.5. Fermentação.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Local do experimento .....	16
4.2. Material experimental.....	16
4.2.1. Umidade.....	17
4.2.2. Açúcares Redutores .....	17
4.2.3. Amido .....	19
4.3. Hidrólise .....	19
4.3.1. Hidrólise ácida .....	20
4.3.2. Hidrólise enzimática .....	20
4.4. Fermentação.....	20
4.4.1. Delineamento Experimental .....	21
4.5. Destilação .....	22
4.6. Teor alcoólico .....	22
4.7. Análises estatísticas .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26

5.1. Matéria-prima .....	26
5.1.1. Umidade.....	27
5.1.2. Açúcares Redutores .....	27
5.1.3. Amido .....	28
5.2. Fermentação.....	28
5.3. Teor alcoólico .....	29
6. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS .....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Participação de energias renováveis na matriz energética (BEN, 2015) .....	4
<b>Figura 2.</b> Emissões de CO <sub>2</sub> evitadas com o uso de biocombustíveis no ano de 2012 no Brasil (EPE, 2012) .....	5
<b>Figura 3.</b> Consumo final por fonte de energia no Brasil (BEN, 2015).....	6
<b>Figura 4.</b> Estequiometria simplificada da reação de fermentação alcoólica (PAVLAK, 2010) .....	13
<b>Figura 5.</b> Secagem em estufa da batata-doce ralada.....	16
<b>Figura 6.</b> Reação do método de Lane-Eynon (TAVARES <i>et al.</i> , 2010) .....	18
<b>Figura 7.</b> Coloração das soluções de Fehling antes da titulação (azul anil) e após titulação, formação de Cu <sub>2</sub> O (vermelho-tijolo).....	18
<b>Figura 8.</b> Curva de calibração para determinação do teor alcoólico .....	24
<b>Figura 9.</b> Armazenamento da farinha de batata-doce preparada .....	26
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de umidade, açúcares redutores e amido, presentes na farinha de batata-doce.....	27
<b>Figura 11.</b> Diagrama de Pareto para efeitos padrões – Álcool HA .....	34
<b>Figura 12.</b> Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise ácida em função da temperatura e do tempo .....	35
<b>Figura 13.</b> Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise ácida em função da temperatura e do tempo.....	36
<b>Figura 14.</b> Diagrama de Pareto para efeitos padrões – Álcool HE.....	37
<b>Figura 15.</b> Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e da temperatura .....	38
<b>Figura 16.</b> Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e da temperatura.....	39
<b>Figura 17.</b> Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e do pH .....	40
<b>Figura 18.</b> Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e do pH.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°GL</b>	graus Gay-Lussac (% teor alcoólico v/v)
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>GEE</b>	gases de efeito estufa
<b>ha</b>	hectare
<b>HA</b>	hidrólise ácida
<b>HE</b>	hidrólise enzimática
<b>kcal</b>	kilocaloria
<b>NAD</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>OCDE</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>t</b>	tempo (dias)
<b>T</b>	temperatura (°C)
<b>UE</b>	unidade enzimática

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Planejamento fatorial completo 2x3 com três pontos centrais. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Variáveis utilizadas no planejamento fatorial.....	22
<b>Tabela 3.</b> Delineamento fatorial para estudo da formação de álcool obtido por hidrólise ácida e hidrólise enzimática da batata-doce.....	31
<b>Tabela 4.</b> Valores referentes à Correlação de Pearson, adaptado de Barbetta, (2006). ....	33
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância da produção de álcool por meio de hidrólise ácida em função do pH, tempo e temperatura. ....	34
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância da produção de álcool por meio de hidrólise enzimática em função do pH, tempo e temperatura.....	38

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Umidade.....	16
<b>Equação 2.</b> Açúcares Redutores.....	18
<b>Equação 3.</b> Amido.....	19
<b>Equação 4.</b> Equação da reta para determinação do teor alcoólico.....	23
<b>Equação 5.</b> Teor alcoólico em °GL.....	24
<b>Equação 6.</b> Teor alcoólico em °GL.....	24
<b>Equação 7.</b> Modelo final (ANOVA) utilizando como resposta a produção de etanol via hidrólise ácida (HA).....	33
<b>Equação 8.</b> Modelo final (ANOVA) utilizando como resposta a produção de etanol via hidrólise enzimática (HE).....	37

## RESUMO

SANTOS, Eveline Gheller dos. **Produção de álcool a partir de batata-doce com variações nas condições de fermentação.** 2015. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava-PR. 2015.

O planeta enfrenta diversos problemas ambientais causados a partir das emissões de gás carbônico na atmosfera, acarretando muitos investimentos para que pesquisas sejam desenvolvidas visando o controle e/ou minimização dos danos causados por tais emissões. Tendo em vista a importância do álcool combustível como forma de minimizar a quantidade de CO<sub>2</sub> emitido em todo o planeta, o presente trabalho tem por objetivo a produção de álcool, a partir da farinha de batata-doce, utilizando variações nas condições do processo fermentativo (pH, temperatura e tempo). A matéria-prima utilizada foi caracterizada quanto aos teores de umidade, açúcares redutores e amido, sendo seus valores em porcentagens, de 4,13, 4,04 e 71,80, respectivamente. Para verificação do melhor processo visando a obtenção de elevados teores alcoólicos, foram realizadas hidrólises do tipo ácida e enzimática. As amostras de destilados que apresentaram maiores percentuais alcoólicos foram as realizadas a partir da hidrólise ácida, sendo 26,42% a de maior percentual alcoólico. Com relação às amostras de destilados feitas a partir de hidrólise enzimática, o maior percentual alcoólico encontrado foi de 25,04%. Para ambas as amostras que apresentaram elevado teor alcoólico, as fermentações foram realizadas em condições de pH 5,0, temperatura de 36°C, durante o período de cinco dias. Demonstrando assim que a variável de tempo destacou-se, apresentando maiores valores de significância para ambos os tipos de hidrólises utilizadas no presente estudo.

**Palavras-Chave:** *Ipomoea batatas* L.; hidrólise ácida; hidrólise enzimática; bioenergia; bioetanol.

## ABSTRACT

SANTOS, Eveline Gheller dos. **Alcohol production from sweet potato with changes in fermentation conditions.** 2015. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava-PR. 2015.

One of the major environmental issues facing the planet has been the drastic increase in the emission of CO<sub>2</sub> (carbon dioxide) in the atmosphere, causing many investments in the environmental research for to control and/or minimize the damages caused by these emissions. Given the importance of ethanol as a way to minimize the amount of CO<sub>2</sub> emitted around the world, this study aims to produce ethanol from sweet potato flour, varying reaction conditions for fermentation, such as pH, temperature and time. The raw material was characterized from the moisture, reducing sugars and starch, and its values in percentages were 4.13, 4.04 and 71.80, respectively. In order to check the best process for achieving high alcohol levels, experiments were performed hydrolysis of acid and enzymatic type. The distillate samples showed that the higher alcohol percentages were made from acid hydrolysis, being 26.42% the maximum alcohol percentage obtained. In relation to the distillate samples made from enzymatic hydrolysis, the higher alcohol percentage was found to be 25.04%. For both samples with high alcohol content, fermentations were performed at pH 5.0 and 36 °C, during a period of five days. The fermentation time was the most important variable, with higher significance values for both types of hydrolysis used in this study.

**Key Words:** *Ipomoea batatas* L.; acid hydrolysis; enzymatic hydrolysis; bioenergy; bioethanol.

# 1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento e aprimoramento de fontes alternativas de energia, devido à problemas ambientais como o aquecimento global, degelo polar, interferências nos ciclos biogeoquímicos, o efeito estufa, dentre tantas outras transformações que vêm acontecendo em nosso planeta, devido à ações desregradas da humanidade.

Tendo em vista alguns dos problemas anteriormente citados, os biocombustíveis vêm se destacando mundialmente como alternativa para contribuir na diminuição da emissão de dióxido de carbono na atmosfera, gás causador do efeito estufa, conseqüentemente do aquecimento global e do degelo polar, podendo interferir ainda, no ciclo biogeoquímico do carbono.

Segundo Nitsch (1991), o interesse mundial por biocombustíveis iniciou-se na década de 70, especificamente em 1973 com a Crise Mundial do Petróleo, fazendo com que em 1975 o Brasil criasse o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), o qual visava incentivar a produção de etanol no país destacando-se mundialmente por sua eficiência.

De acordo com Sachs (2005) no ano de 1900, Rudolph Diesel utilizou óleo de amendoim em seu motor e após mais de um século, os biocombustíveis chegaram a sua maturidade, devido a três fatores principais: os preços do petróleo, por serem voláteis e crescentes; incertezas e perigos representados pela geopolítica do petróleo; necessidade de substituição de combustíveis fósseis.

Canova (2011) aponta a possível escassez de combustíveis fósseis como fator intensificador da busca por novas fontes bioenergéticas, sendo o etanol produzido por meio de diferentes matérias-primas uma boa fonte energética.

O álcool (biocombustível) é produzido por meio da fermentação, para que possa utilizar fontes de matéria-prima renováveis. Estas podem ser utilizadas na produção do biocombustível, caso contenham quantidades consideráveis de carboidratos fermentescíveis, podendo classificá-las em três categorias específicas: materiais açucarados, amiláceos ou celulósicos (CANOVA, 2011).

Diferentes culturas que armazenam açúcares e amido podem representar excelentes alternativas para a produção de álcool. A batata-doce é um material amiláceo que apresenta grande potencial produtivo e energético para a produção de álcool combustível, devido às elevadas quantidades de amido e açúcares redutores presentes na mesma. Outros fatores que

favorecem a produção de álcool a partir da batata-doce são a rusticidade da cultura, o aproveitamento de material rejeitado, bem como a adequação a diversos tipos climáticos (FELTRAN e VALLE, [2008?]).

No presente trabalho, determinaram-se os teores de umidade, açúcares redutores e amidos apresentados pela farinha do clone 119 da Coleção de batatas-doces da Unicentro. A partir da realização de dois tipos de hidrólises, ácida e enzimática, realizou-se fermentação em diferentes condições de pH, temperatura e tempo para obtenção de álcool, o qual após destilação teve seu teor alcoólico quantificado.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Produção de álcool de farinha de batata-doce do clone 119 da Coleção de batatas-doces da Unicentro utilizando diferentes condições de fermentação.

### **Objetivos específicos:**

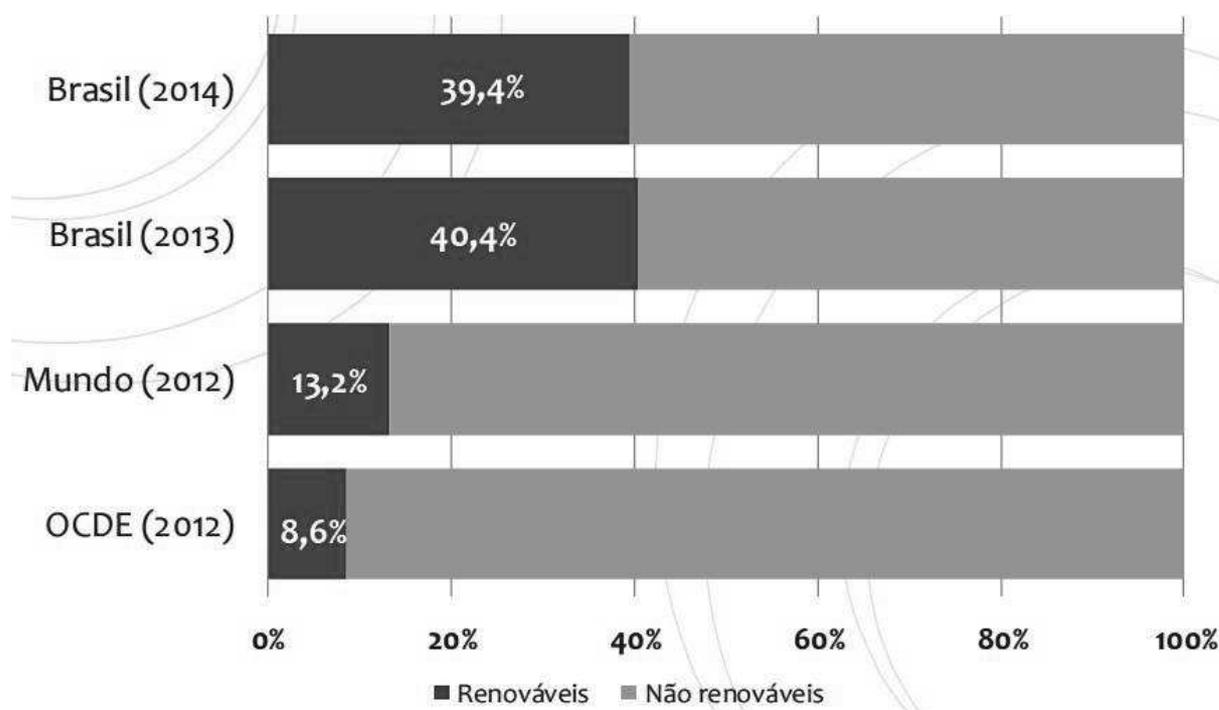
1. Caracterizar a cultivar de batata-doce quanto aos teores de umidade, açúcares redutores e amido;
2. Realizar hidrólises ácida e enzimática do amido presente na farinha de batata-doce;
3. Produzir álcool por meio da fermentação dos açúcares presentes na batata-doce.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Matriz energética

A matriz energética compreende toda forma de energia que pode ser transformada e consumida. Sendo estas divididas entre fontes renováveis e não renováveis (EPE, 2012).

O Brasil é considerado um exemplo mundial com relação ao fornecimento de energia, como se pode observar na Figura 1. Em 2014 a Matriz Energética Brasileira manteve-se entre as mais elevadas do mundo na utilização de energias renováveis, havendo uma pequena redução com relação ao ano de 2013, devido à menor oferta de energia hidráulica (BEN, 2015).



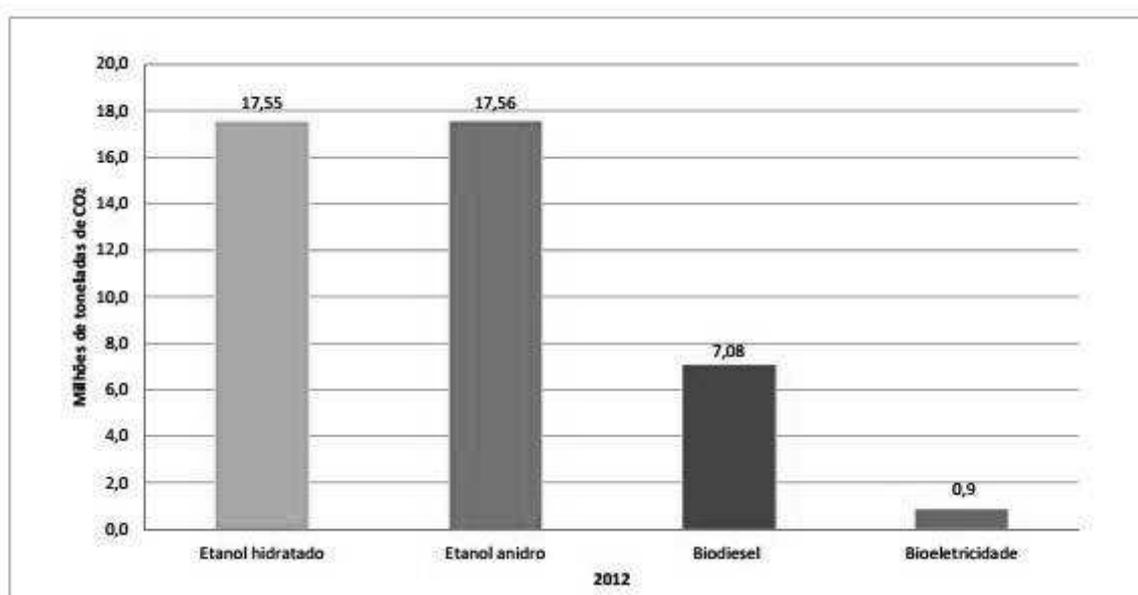
**Figura 1.** Participação de energias renováveis na matriz energética (BEN, 2015)

No passado, o uso de biocombustíveis no Brasil desempenhou um papel estratégico na substituição do petróleo importado, em momentos nos quais tal importação onerava sobremaneira o balanço de pagamentos brasileiros. Atualmente, os biocombustíveis renováveis têm grande relevância, tanto no cenário nacional quanto internacional. Em nível nacional, contribuem para o desenvolvimento e para manter mais limpa a matriz energética do

País, assim como para o crescimento das exportações. No âmbito internacional, os biocombustíveis são um importante aliado no esforço global de redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) e contribuem para amenizar as mudanças climáticas globais (EPE, [?]).

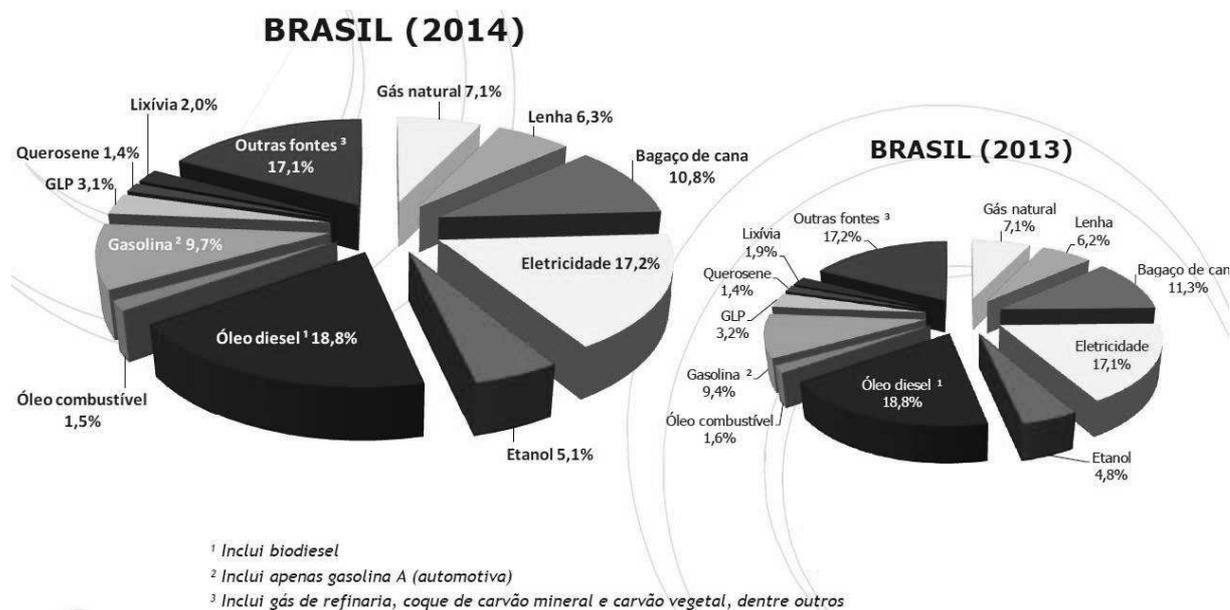
Considerando-se a crescente crise de combustíveis nos Estados Unidos e em outros países, sendo tanto em países desenvolvidos e em desenvolvimento, é crucial a produção de combustíveis que possam substituir a utilização do petróleo. Muitos países possuem oportunidade para a produção do combustível bioetanol, a partir de culturas que não competem com a produção de alimentos para consumo humano (JUSUF e GINTINGA, 2014).

A utilização de biocombustíveis na matriz energética nacional proporciona uma significativa redução nas emissões de GEE. As emissões evitadas, medidas em toneladas de CO<sub>2</sub> equivalente, decorrentes do uso de biocombustíveis renováveis (etanol anidro e hidratado e biodiesel), em detrimento de seus equivalentes fósseis: gasolina e diesel são apresentadas na Figura 2 (EPE, 2012). Destacando-se o biocombustível etanol, tendo em vista que ambos os tipos, hidratado e anidro, são os mais importantes, ao evitar maiores quantidades de emissões de CO<sub>2</sub>. O etanol é o biocombustível mais importante, contribuindo com mais de 90% do total de energias renováveis utilizadas (SHANAVAS *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Emissões de CO<sub>2</sub> evitadas com o uso de biocombustíveis no ano de 2012 no Brasil (EPE, 2012)

Na Figura 3 encontra-se representado o consumo final por fonte de energia dos anos de 2013 e 2014, podendo-se observar um pequeno aumento de 0,3% no consumo de etanol em nosso país durante esse período (BEN, 2015).



**Figura 3.** Consumo final por fonte de energia no Brasil (BEN, 2015)

### 3.1.1. Álcool

O Brasil é referência na produção de agroenergia, por meio de programas como o do etanol e do biodiesel, os quais destacam-se mundialmente na oferta de alternativas econômica e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis. Devido a menor poluição e custo, a geração de energia utilizando produtos agrícolas representa a segunda principal fonte de energia do país. O consumo de gasolina é superado pelo do álcool na gasolina e o do biodiesel no diesel, já possuindo participação relevante na matriz brasileira de combustíveis ao se tornarem obrigatória as misturas (MAPA, 2014).

O álcool é um excelente combustível para ser adicionado à composição da gasolina, podendo ser utilizado de 5-10%, sem que ocorra qualquer alteração no motor do veículo (JUSUF e GINTINGA, 2014).

O álcool pode ser produzido de duas maneiras, pela síntese química e por meio da fermentação. O etanol é produzido quimicamente a partir de hidrocarbonetos insaturados, tais como eteno e etino, e ainda, de gases de petróleo e hulha. Sendo assim, o etanol produzido pela síntese química não é considerado um combustível alternativo, pois provém de matérias-

primas não renováveis. No Brasil e na maioria dos países, o etanol é produzido pelo método fermentativo, o qual se constitui de três partes: preparo do substrato, fermentação e destilação do fermentado (CANOVA, 2011).

Desde que contenha uma quantidade considerável de carboidratos, pode-se obter de qualquer produto, a matéria-prima necessária para produção de álcool. Podendo classificá-las em três tipos, de acordo com o tipo de carboidrato presente na mesma:

- materiais açucarados: possuem açúcares simples, como glicose, frutose e maltose. Os dissacarídeos são fermentados após a enzima invertase, a qual é produzida pelo próprio agente de fermentação, realizar hidrólise. Ex: cana-de-açúcar, melaços, beterraba açucareira, frutas, entre outros;
- materiais amiláceos: contêm amido, o qual pode ser quebrado em glicose por meio de hidrólise ácida ou enzimática, processo denominado sacarificação ou malteação. Ex: raízes, grãos amiláceos (milho, sorgo, cevada, trigo) e tubérculos raízes (batata, batata-doce e mandioca);
- materiais celulósicos: são constituídos por celulose, glicose, hemicelulose e lignina. Envolvem um processo complexo de hidrólise ácida para que se possa obter o etanol, tornando-se inviável. Ex: madeira, palha, resíduos agrícolas e de fábricas de papel (CANOVA, 2011).

A utilização de matérias-primas amiláceas, destacando-se a utilização de batata-doce, na produção de biocombustíveis não é algo recente, já em 1909 foi publicado um estudo onde foram avaliados os principais interferentes (produtividade e teor de massa seca de raízes) no rendimento de etanol, sendo sugerido que a produtividade de raízes seria o principal fator. Entretanto, quando os genótipos possuem teores de amido diferentes, verifica-se que o amido possui maior contribuição no rendimento de etanol. No período da segunda guerra mundial, o Japão utilizou como combustível, o etanol produzido a partir da batata-doce (KEITT, 1909; BOSWELL, 1944; NEELY, 1997).

Dentre as matérias-primas amiláceas, os tubérculos e raízes apresentam uma grande vantagem por possuir alto teor de carboidratos. Conseqüentemente, detendo um alto potencial para a produção de etanol por hectare. Possuem ainda a vantagem de serem culturas que podem ser cultivadas em solos marginais, onde outras culturas não se desenvolvem satisfatoriamente (THU LAN THI NGUYEN e GARIVAIT, 2007; YANG *et al*, 2011).

Para a produção do álcool a partir da batata-doce, faz-se necessária a hidrólise do amido presente nela, por via ácida ou enzimática, para que esse possa ser convertido em

açúcar fermentescível, para que então, a partir da fermentação por leveduras seja produzido o álcool por meio desse açúcar (CANOVA, 2011).

Segundo Bradbury (1990) a batata-doce apresenta concentrações de amido e açúcares em torno de 20,1% e 2,38%, respectivamente. Levando-se em consideração que o rendimento do álcool produzido por meio desse material amiláceo está diretamente relacionado a esses teores, é de extrema importância a realização de estudos relacionados a essas quantificações.

De acordo com Servino (2011), cerca de 40% da produção de batata-doce não apresenta o padrão de comercialização, podendo este descarte ser destinado à produção de etanol, a qual é realizada por meio da hidrólise enzimática a partir da ação de enzimas amilóticas.

McArdle e Bouwkamp (1982) utilizando cultivares de batata-doce com alto teor de amido nas raízes avaliaram o potencial da batata-doce para a produção de etanol. Encontrando produtividades superiores a 5,8 toneladas por hectare de amido em sistema produtivo com baixa utilização de insumos agrícolas e taxa de conversão em etanol superior a 76%.

### **3.2. Batata-doce**

*Ipomoea batatas L. (Lam.)*, conhecida popularmente pelo nome de batata-doce possui origem na América Central e América do Sul. Há relatos de sua utilização há mais de dez mil anos, baseada em análise de batatas secas encontradas em cavernas no vale de Chilca Canyon, no Peru e em evidências contidas em escritos arqueológicos encontrados na América Central, na região ocupada pelos Maias (SILVA *et al*, 2008).

Silva *et al.* (2008) diz que a batata-doce pode ser plantada em regiões localizadas desde a latitude de 42°N até 35°S, desde o nível do mar até 3.000 metros de altitude, em locais com climas diversificados como o da Cordilheira dos Andes; em regiões tropicais, como a Amazônia; de clima subtropical como no Rio Grande do Sul e até desértico, como o ILS-03 do Pacífico.

A batata-doce é cultivada em 111 países, sendo que aproximadamente 90% é produzida na Ásia, 5% na África e apenas outros 5% no restante do mundo. Somente 2% da produção mundial é desenvolvida em países industrializados como os Estados Unidos e Japão. Com 100 milhões de toneladas, a China é o maior produtor dessa cultura (WOOLFE, 1992; FAO, 2001).

O Brasil é o décimo maior produtor mundial de batata-doce, com 82.000 ha de área cultivada. Apesar de ser produzida em todas as regiões, seu cultivo encontra-se mais presente

nas regiões Sul e Nordeste, destacando-se os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco e Paraíba. A Região Sul é a principal produtora da amilácea, sendo responsável por 50,44% da produção nacional, seguida pelo Nordeste, com 33,60% e pela Região Sudeste, com 15,16% (SILVA *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*; 2009).

Ao ser colhida, a batata-doce apresenta cerca de 30% de massa seca, a qual possui cerca de 85% de carboidratos, sendo o amido o principal componente. Comparando-se a outras amiláceas, esta possui maior conteúdo de massa seca, carboidratos, lipídios, cálcio e fibras que a batata comum, mais carboidratos e lipídios que o Inhame e ainda, mais proteína que a mandioca (EMBRAPA, 2008). Durante seu armazenamento, parte do amido se converte em açúcares solúveis, de 13,4 a 29,2% de amido e de 4,8 a 7,8 % de açúcares totais redutores (SILVA *et al.*, 1995).

A utilização da batata-doce para a produção de etanol é mais vantajosa se comparada à mandioca, devido aos menores custos de produção, uma vez que podem ser colhidas mecanicamente e com menor tempo de colheita (4-5 meses) em comparação com a mandioca (10 meses), não diferindo muito nos teores de amido apresentados pelas mesmas (JUSUF e GINTINGA, 2014).

São inúmeras as vantagens que a batata-doce oferece como matéria-prima na produção de etanol e conseqüentemente proporcionando muitos benefícios. Além do foco ambiental, o etanol gera em países como o Brasil, entre outros, impactos econômico-sociais de primeira grandeza, como a melhoria da renda rural; a reconhecida capacidade de distribuição desses efeitos na cadeia produtiva sucroalcooleira; geração de empregos em larga escala; redução de dependência externa de petróleo e melhoria da balança comercial (NEGRÃO, 2005).

As raízes da batata-doce são muito utilizadas na culinária doméstica de inúmeras maneiras e ainda é útil como matéria-prima para processos industriais. Possuindo ainda, grande importância na alimentação animal, pois sua forragem apresenta alto rendimento e qualidade, as quais podem ser consumidas até mesmo no período seco (OLORUNNISOMO *et al.*, 2006; ROESLER *et al.*, 2008).

### **3.3. Açúcares**

A batata-doce possui em sua composição açúcares simples como: sacarose, frutose, maltose, glicose, sendo este último um tipo de açúcar redutor (CEREDA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O monossacarídeo glicose é um açúcar redutor porque possui grupos carbonílico e cetônico livres, os quais são capazes de oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (SILVA, *et al.*, 2003).

Muitos reagentes são utilizados para demonstrar a presença de grupos redutores, nos açúcares. Os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente fracos, como íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (VILLELA *et al.* 1973; SILVA *et al.*, 2003).

Os métodos químicos mais conhecidos para analisar açúcares redutores são geralmente fundamentados na redução de íons cobre em soluções alcalinas (Solução de Fehling) (LANE e EYNON, 1934; SILVA *et al.*, 2003).

### **3.4. Amido**

Em inúmeras espécies vegetais o amido encontra-se amplamente distribuído como um carboidrato de reserva, principalmente em grãos de cereais (40% a 90% de massa seca), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos e raízes (65% a 85% de massa seca) e frutas maduras ou verdes (40% a 70% da massa seca). É ainda a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80% a 90% de todos os polissacarídeos da dieta. Armazena-se como grânulos insolúveis em água, apresentando certo grau de organização molecular, atribuindo-lhes um caráter parcialmente cristalino, ou semicristalino, com graus de cristalinidade variando entre 20 e 45% (YOUNG, 1984; WHO/FAO, 1998; LAJOLO e MENEZES, 2006).

Segundo Singh *et al.* (2003) o amido é o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados, contribuindo para diversas propriedades de textura em alimentos, possuindo aplicações industriais como espessante, estabilizador de colóides, agente gelificante e de volume, adesivo, na retenção de água, dentre outros.

Os grânulos encontram-se localizados em organelas especiais, sendo que nas folhas, o amido é sintetizado e armazenado nos cloroplastos ou nos amiloplastos. Quando armazenado nos cloroplastos, ele é produzido no período fotossintético, sendo rapidamente metabolizado durante período noturno. Os amiloplastos são encontrados em vários tecidos e órgãos não fotossintetizantes, tais como parênquima de raízes e caules, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes (BECK e ZIEGLER, 1989; AMARAL *et al.*, 2007).

Estruturalmente, o amido é composto por unidades de glicose, organizadas em dois

homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina, com estruturas e funcionalidade diferentes. A amilose praticamente não apresenta ramificações, sendo considerada linear, onde as unidades de glicose são conectadas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 e a porcentagem de ramificações  $\alpha$ -1,6 é menor que 1%. A amilopectina, uma das maiores biomoléculas conhecidas, sendo extremamente ramificada, possui cadeias de resíduos de glicose ligados entre si por meio de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 com aproximadamente 5% de ramificações  $\alpha$ -1,6 (BALL *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 2000; ELIASSON, 2008; TESTER *et al.*, 2004).

Dependendo de sua origem, o amido apresenta diferentes proporções de amilose e de amilopectina. Geralmente as proporções variam em torno de 1:3 e 1:4, entretanto há extremos encontrados em mutantes, cujo amido não possui amilose. Variações nas proporções destes componentes, suas estruturas e propriedades podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais muito diferentes, podendo afetar as suas aplicações industriais (NELSON e PAN, 1995; MALI, GROSSMANN e YAMASHITA, 2010).

A amilopectina é, estrutural e funcionalmente, a mais importante das duas frações que compõem o amido, sendo sozinha suficiente para formar o grânulo, como ocorre nos mutantes que são desprovidos de amilose. Com relação à amilose, sua localização exata dentro do grânulo ainda é complexa. Acredita-se que ela esteja localizada entre as cadeias da amilopectina e aleatoriamente entre as regiões amorfas e cristalinas. As moléculas de amilose maiores concentram-se no centro do grânulo e, provavelmente participam das duplas hélices com a amilopectina, enquanto as moléculas menores presentes na periferia podem ser lixiviadas para fora do grânulo. Apesar da pouca função na formação de cristais, a amilose pode influenciar a organização das duplas hélices, intervindo na densidade de empacotamento das cadeias de amilopectina (OATES, 1997; TESTER *et al.*, 2004).

### **3.4.1. Hidrólise**

A hidrólise do amido pode variar muito, dependendo de inúmeros fatores, particularmente, a origem botânica do amido, o que determina a morfologia (tamanho, características da superfície, os poros e os canais periféricos) e organização cristalina (LEHMANN e ROBIN, 2007).

A hidrólise do amido pode ser feita com catalisador ácido, a combinação de ácido e enzimas, e até mesmo uma combinação de enzimas. Utilizando ácidos fortes, como o ácido clorídrico e ácido perclórico ou digestão enzimática por meio das enzimas, amiloglicosidase

obtida do fungo *Aspergillus niger* e  $\alpha$ -amilase, a qual é obtida do fungo *Aspergillus oryzae* (MCCREADY, 1970; HAISSIG e DICKSON, 1979; MANNERS, 1985; AMARAL *et al.*, 2007; JUSUF e GINTINGA, 2014).

A hidrólise do tipo enzimática possui vantagem da especificidade de quebra de ligação, agregando maior controle sobre os produtos formados, entretanto apresenta custo elevado. Em contrapartida, a hidrólise ácida envolve um menor custo, porém não é possível ter muito controle sobre a quebra que o ácido realizará na molécula de amido (SUMERLY *et al.*, 2003).

No processo de hidrólise enzimática, a  $\alpha$ -amilase atua em toda a cadeia do polissacarídeo e produz açúcares do tipo glicose, maltose e dextrina, dentre eles a glicose é o açúcar ideal para se utilizar na fermentação. A  $\alpha$ -amilase atua na catálise e clivagem das ligações, predominantemente  $\alpha$ -1,4 e apresenta maior fluidez quando elevadas ao ponto de gelatinização do amido, diminuindo opacidade e viscosidade (APAR e OZBEK, 2003; AEHLE, 2007).

Durante as fases iniciais da hidrólise ácida ocorre a hidrólise da amilopectina nos pontos de ramificação ou próximo a eles, gerando hidrolisado contendo fragmentos de amido (cadeias lineares, duplas hélices, porções cristalinas, etc.) (VASANTHAN e BHATTY, 1998).

O processo de hidrólise demanda um intenso consumo de energia, aumentando significativamente o custo da produção de etanol à base de amido. Estima-se que a absorção de energia dessa etapa da produção equivale entre 30% e 40% do total da energia exigida durante a produção de etanol a partir de amido (LEE W-S, 2012).

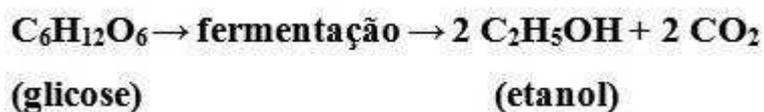
### **3.5. Fermentação**

A fermentação etanólica é um processo catabólico anaeróbico muito complexo, onde ocorre a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de micro-organismos, até a formação de etanol e CO<sub>2</sub>, bem como de outros compostos como ácidos succínicos, ácidos voláteis e ésteres, havendo liberação de energias química e térmica (VENTURINI FILHO, 2005; LEHNINGER *et al.*, 2006).

Do ponto de vista bioquímico, a fermentação consiste na degradação da glicose em etanol. No caso da batata-doce que é uma matéria-prima amilácea, a glicose é obtida mediante hidrólise do amido, e entra na via glicolítica. A glicose é convertida em piruvato por uma sequência de reações denominada glicólise. A formação de etanol a partir do piruvato, em

leveduras ocorre por meio de duas etapas: a primeira consiste na sua descarboxilação para formar acetaldeído e CO<sub>2</sub>, sendo catalisada pela enzima piruvato descarboxilase; na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase I (ADH1) (LEHNINGER, 2006).

A transformação de um mol de glicose (180 g) em etanol e CO<sub>2</sub>, durante o processo de fermentação alcoólica libera uma quantidade de energia equivalente a 56 kcal, onde aproximadamente 40 kcal são despreendidas com o oxigênio e o calor restante (16 kcal) é armazenado como energia química, na forma de adenosina trifosfato (ATP). Conseqüentemente, há uma elevação de temperatura durante o processo de fermentação, a qual geralmente necessita do emprego de refrigeração para se manter a temperatura na faixa ótima para a atividade da levedura alcoólica. Simplificadamente, a estequiometria da fermentação alcoólica pode ser representada como segue (Figura 4):



**Figura 4.** Estequiometria simplificada da reação de fermentação alcoólica (PAVLAK, 2010)

Detalhadamente, inicia-se com a glicólise, também conhecida como *via Embden-Meyerhof*, ocorrendo oxidação da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico, sendo na presença ou não de oxigênio. No primeiro momento, para a fosforilação da molécula de glicose são utilizadas duas moléculas de ATP, em seguida é reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato, que rapidamente também se converte em gliceraldeído-3-fosfato. No segundo momento, as moléculas de gliceraldeído produzidas são oxidadas em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, ocorre a redução de duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) a NADH e quatro moléculas de ATP são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada. Após a glicólise, ocorre a conversão de duas moléculas de ácido pirúvico em dois acetaldeídos e duas moléculas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Para a formação do etanol, produto final da fermentação, as moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH (TORTORA *et al.*, 2005; LEHNINGER, 2006).

A fermentação etanólica inicia-se com a adição do micro-organismo ao meio fermentativo, que é rico em açúcares. São necessárias três fases para que ocorra o processo de

fermentação: logo após a adição do micro-organismo temos a fase *lag*, em que ocorre a adaptação dos micro-organismos ao novo ambiente, onde os mesmos dão início a seu crescimento, existindo ainda, oxigênio disponível para ocorrer o desenvolvimento das leveduras; a segunda fase, conhecida como fase exponencial, é determinada pelo grande aumento de micro-organismos e pela liberação de gás carbônico, nesta fase o crescimento é na ordem de  $2^n$  (exponencial); durante essa fase ocorrerá aumento de temperatura e teor alcoólico; na terceira fase, a estacionária, o alimento já está muito pobre no meio e o crescimento das leveduras é afetado, havendo diminuição de gás carbônico e precipitação do micro-organismo. A fase de autólise é caracterizada pela morte celular, pois o próprio meio, que é rico em etanol já não beneficia o micro-organismo. No final da fermentação o produto obtido é o caldo bruto, que apresenta de 8 a 12% de álcool (SILVA *et al.*, 2008).

Dentre os diversos fatores que afetam o processo de fermentação, tem-se a temperatura, o pH, a presença de inibidores, nutrição mineral e orgânica, concentração de açúcares, e a possibilidade de contaminação bacteriana (LIMA *et al.*, 2001; PAVLAK, 2010).

A temperatura ótima para produção industrial de etanol encontra-se na faixa de 26°C a 35°C. Altas temperaturas de fermentação podem favorecer a contaminação bacteriana, aumento do tempo de fermentação e estresse da levedura (PAVLAK, 2010).

As fermentações podem se desenvolver numa ampla faixa de pH, sendo adequadas entre 4,0 e 5,0. A tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras utilizadas em indústrias (PAVLAK, 2010).

Woolfe (1992) apresenta em seus estudos, valores de composição média da batata-doce, onde estão presentes alguns minerais que podem colaborar no processo fermentativo, tais como cálcio (32 mg 100 g<sup>-1</sup>) e fósforo (39 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Ao aumentar a concentração de açúcares no meio fermentativo, aumenta-se a velocidade de fermentação, a produtividade e dentro de certos limites, acarreta menor crescimento da levedura. Contudo, elevado teor de açúcares acarreta um estresse osmótico da levedura. Portanto, dependendo do processo de fermentação que se realiza, existe uma faixa de concentração de açúcares considerada como ideal (PAVLAK, 2010).

As leveduras são os micro-organismos mais utilizados na obtenção de etanol por via fermentativa. As leveduras mais comumente utilizadas na fermentação alcoólica têm sido as do gênero *Saccharomyces*, destacando-se as *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras desse gênero também são consideradas como GRAS (*generally recognized as safe*), podendo ser utilizadas como aditivo em alimentos para consumo humano, conseqüentemente sendo também ideais para a produção de bebidas alcoólicas e fermento de pão. Leveduras dessa

linhagem são utilizadas ainda, na fabricação de combustíveis. Outras leveduras também possuem capacidade de produzir etanol, bem como algumas espécies de bactérias, como, por exemplo, *Zymomonas mobilis* (VENTURINI, 2005; CINELLI, 2012).

*Saccharomyces cerevisiae*, pertencente ao filo Ascomycota, apresenta-se predominantemente na forma unicelular, com células tipicamente esféricas ou ovais, não formando micélios. Possuindo reprodução assexuada, geralmente por brotamento. É um aeróbio facultativo, tendo habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose, quanto de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular) (LIMA *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2005).

A *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na produção comercial de etanol proveniente de açúcares, tais como os da sacarose da cana de açúcar e os da maltose do amido do milho (TIBAYRENC, 2011).

Uma grande quantidade do etanol produzido no Brasil é obtida por meio da fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, por ser um gênero de levedura considerado como seguro (GRAS). Entretanto, ela metaboliza apenas açúcares simples, tais como glicose e frutose, justificando a necessidade das etapas de hidrólise e sacarificação, quando a matéria-prima é rica em amido (FREITAS, 1999; PAVLAK, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal/Horticultura, do Departamento de Agronomia, *Campus* CEDETEG da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO.

### 4.2. Material experimental

Para a realização dos experimentos utilizou-se farinha de batata-doce do Clone 119 da Coleção do Departamento de Agronomia da Unicentro, previamente preparada. Para obtenção da farinha, as batatas-doces foram lavadas, pesadas, raladas e acondicionadas em estufa de secagem modelo Q3171-22, da QUIMIS à temperatura de 65 °C durante o período de 72 horas até atingir peso constante (Figura 5). Posteriormente, as amostras foram trituradas utilizando-se moinho de facas elétrico, com peneira de 20 mesh, obtendo-se a farinha de batata-doce. Após trituração, a farinha foi armazenada em recipiente hermeticamente fechado e mantido em temperatura de 10 °C.



**Figura 5.** Secagem em estufa da batata-doce ralada

#### 4.2.1. Umidade

Utilizando-se o método 413/IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) para determinação de umidade em farinhas, pôde-se calcular o teor de umidade contido na mesma. Cinco cápsulas de porcelana previamente aquecidas em estufa a 130 °C foram resfriadas em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e pesadas. Foram coletadas nas cápsulas, amostras contendo 2 g aproximadamente, as quais foram acondicionadas em estufa a 130 °C, durante o período de uma hora. As amostras foram retiradas da estufa e resfriadas em dessecador, a temperatura ambiente. Por fim, foram determinadas as massas correspondentes às amostras sendo os valores expressos em porcentagem.

Para determinar-se o teor de umidade contido na farinha de batata-doce utiliza-se a Equação 1:

$$\text{Umidade a } 130\text{ }^{\circ}\text{C por cento (m/m)} = \frac{100 \times m}{MA} \quad \text{Equação 1}$$

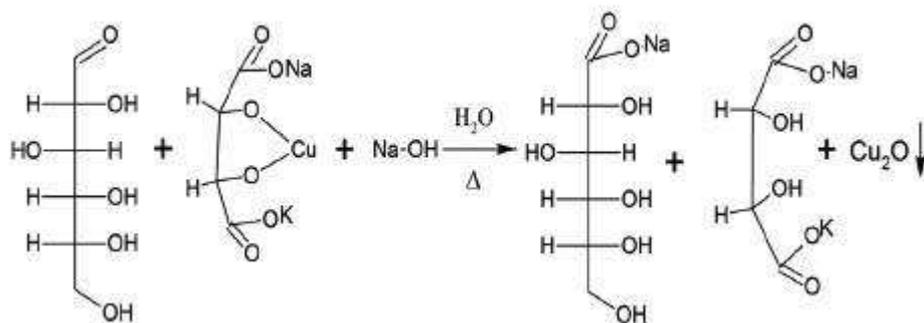
Onde:

m = massa de umidade em gramas

MA = massa da amostra

#### 4.2.2. Açúcares Redutores

Utilizando-se o método 038/IV do IAL (2005), determinou-se os açúcares redutores por meio do método de Lane-Eynon (Figura 6), utilizando-se reagentes de Fehling. Preparou-se previamente as soluções A e B de Fehling. Para o preparo da solução A utilizou-se 34,648 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para 1 L de água destilada; para a solução B utilizou-se 173,040 g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 250 mL de água destilada gelada, adicionando-se 250 mL de NaOH 20% quente. Os reagentes de Fehling foram padronizados por meio de titulação com glicose a 1%. Transferiu-se 10 g de farinha de batata-doce para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada. A solução foi filtrada em papel filtro e em seguida, utilizada na bureta para titulação. Em um erlenmeyer, adicionou-se 10 mL de cada uma das soluções A e B de Fehling, 40 mL de água destilada e aqueceu-se até ebulição. A titulação foi realizada durante a ebulição até que a solução aquecida passasse de azul para incolor com precipitados de cor vermelho-tijolo. Os valores foram expressos em porcentagem.



**Figura 6.** Reação do método de Lane-Eynon (TAVARES *et al.*, 2010)

Na Figura 7 é possível observar com clareza as colorações azul anil e “vermelho-tijolo”, anteriormente citadas.



**Figura 7.** Coloração das soluções de Fehling antes da titulação (azul anil) e após titulação, formação de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (vermelho-tijolo)

A partir da Equação 2, calculou-se o percentual de açúcar redutor contido na farinha de batata-doce:

$$AR = \frac{100 \times A \times TL}{MA \times LM} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

AR = percentual de açúcares redutores

A = 100 mL

TL = título do licor de Fehling

MA = massa da amostra

LM = leitura média, leitura do volume gasto na titulação da amostra

### 4.2.3. Amido

As moléculas de glicose provenientes do amido foram quantificadas baseadas pelo método de Lane-Eynon, segundo 038/IV do IAL (2005). Lavou-se um grama de farinha de batata-doce com soluções hidroalcoólicas na proporção de 80:20 (água-álcool) e 90:10 (água-álcool). Filtrou-se e transferiu-se para erlenmeyer com 50 mL de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>. Colocou-se por 20 minutos em banho-maria no micro-ondas com potência máxima. As amostras foram neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH) 10%, utilizando-se três gotas de fenolftaleína. Por fim, as amostras foram tituladas com os reagentes de Fehling e os valores expressos em porcentagem.

Para o cálculo do percentual de amido proveniente da farinha de batata-doce, utilizou-se a equação 3:

$$\% \textit{Amido} = \frac{250 \times TL \times 0,9 \times 100}{LM \times MA} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

250 = volume total da diluição da amostra

TL = título do licor de Fehling

0,9 = fator que transforma os açúcares redutores em amido

100 = usado para expressar o amido em porcentagem (%) na amostra

LM = leitura média, leitura do volume gasto na titulação da amostra

MA = massa da amostra

### 4.3. Hidrólise

Foram realizados dois tipos de hidrólise no experimento, hidrólise ácida e hidrólise

enzimática, para que fosse possível comparar a eficiência de cada uma em relação à produção de etanol.

#### **4.3.1. Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida foi realizada por meio de adaptações de Woiciechowski (2002), utilizando a proporção de 1:10 (m/v) para a quantidade de farinha de batata-doce e ácido clorídrico (HCl), respectivamente. Transferindo-se nove gramas de farinha de batata-doce para erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se 90 mL de HCl 1%. A amostra foi então autoclavada a temperatura de 120°C, com pressão de 1 atm, durante período de 10 minutos. Resfriou-se a amostra e centrifugou-se a 3.000 rpm por 8 minutos, em centrífuga Hettich Zentrifuger MIKRO 220R.

#### **4.3.2. Hidrólise enzimática**

Com adaptações do método utilizado por Pavlak (2011), realizou-se a hidrólise enzimática do amido contido na farinha de batata-doce. Em erlenmeyer de 250,0 mL, adicionou-se 9 g de farinha de batata-doce e 150,0 mL de solução tampão Mc Ilvaine (composta por soluções de ácido cítrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>) de pH 5,5. Realizou-se banho termostático durante 15 minutos, em temperatura de 90°C. Adicionou-se então 13 µL g<sup>-1</sup> de α-amilase (Sigma-Aldrich®), mantendo em banho termostático a 90 °C por uma hora, agitando e homogeneizando o sistema em intervalos de 15 minutos. Resfriou-se a amostra e ajustou-se o pH para 4,5 com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Então, 54 µL g<sup>-1</sup> de amiloglucosidase (Sigma-Aldrich®) foram adicionadas, mantendo-se novamente durante uma hora em banho termostático, a 60 °C, agitando e homogeneizando o sistema em intervalos de 15 minutos. Para obtenção do sobrenadante, o mosto obtido foi centrifugado a 3.000 rpm por 8 minutos.

#### **4.4. Fermentação**

No processo fermentativo o mosto formado pelo material amiláceo foi autoclavado durante 10 minutos, a temperatura de 120 °C e 1 atm, para esterilização de micro-organismos, os quais poderiam influenciar no processo de fermentação. A adição de leveduras comerciais

de *Saccharomyces cerevisiae*, da marca austríaca Nottingham® em concentrações de 8 g L<sup>-1</sup> deram início ao processo fermentativo.

Cada ensaio foi realizado em duplicata, exceto os ensaios dos pontos centrais, os quais foram realizados em triplicata. Três variáveis foram utilizadas no processo fermentativo, pH (4, 4,5 e 5), temperatura (20 °C, 28 °C e 36 °C) e tempo (1, 3 e 5 dias). A levedura consumiu os açúcares obtidos pela hidrólise, ocorrendo conseqüentemente a conversão e produção de álcool com liberação de gás CO<sub>2</sub>. O álcool obtido foi isolado por meio de destilação.

#### 4.4.1. Delineamento Experimental

Foi utilizado no presente trabalho delineamento experimental fatorial 2x3, com três pontos centrais. A Tabela 1 apresenta o planejamento fatorial completo com os valores de níveis codificados.

**Tabela 1.** Planejamento fatorial completo 2x3 com três pontos centrais.

Ensaio	Variáveis		
	pH	T (°C)	Tempo (dias)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9 (C)	0	0	0
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0

Na Tabela 2 constam as três variáveis utilizadas, pH, temperatura (°C) e tempo (dias), com os valores reais utilizados nos diferentes níveis.

**Tabela 2.** Variáveis utilizadas no planejamento fatorial.

Variáveis		
pH	T (°C)	Tempo (dias)
4,0	20	1
4,5	28	3
5,0	36	5

#### 4.5. Destilação

O processo de destilação foi realizado de acordo com o método proposto por Lopes (2013), no qual a temperatura de destilação foi de aproximadamente 75°C, tendo em vista a altitude em que os experimentos foram realizados. A destilação foi realizada em sistema de refluxo simples, utilizando coluna de *vigreux*. O álcool obtido no processo de destilação das amostras foi coletado em banho de gelo, para manter sua estabilidade e armazenado em frascos de vidro com tampa (devidamente identificados), sendo acondicionados em refrigerador do tipo comum em temperatura de 10°C.

#### 4.6. Teor alcoólico

A graduação alcoólica de uma bebida é definida pela porcentagem volumétrica de álcool puro contido na mesma. Por exemplo, um vinho com 10°GL significa que este contém 10% (v/v) de álcool (MARINHO *et al.*, 2009).

A determinação do teor alcoólico apresentado pelas amostras destiladas foi realizada por meio da norma NBR 13920 (ABNT, 1997). Primeiramente, construiu-se uma curva padrão de absorvância em função de concentrações previamente conhecidas de etanol. Uma solução padrão de etanol foi preparada, adicionando-se 0,190 mL de etanol absoluto em balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água destilada até o menisco.

Para a realização do experimento foram utilizadas ainda, outras três soluções: dicromato de potássio ( $K_2CrO_7$ ) a 10% (m/v); ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ); etanol absoluto ( $C_2H_5OH$ ).

Partindo-se da solução padrão de etanol previamente preparada, pôde-se preparar em tubos de ensaio de 20 mL, quatro soluções (A) e um branco (B), os quais foram utilizados na

construção da curva padrão:

- A1: 1,0 mL da solução padrão de etanol e 4,0 mL de água destilada (correspondente a 3,0 mg de etanol);
- A2: 2,0 mL da solução padrão de etanol e 3,0 mL de água destilada (correspondente a 6,0 mg de etanol);
- A3: 3,0 mL da solução padrão de etanol e 2,0 mL de água destilada (correspondente a 9,0 mg de etanol);
- A4: 4,0 mL da solução padrão de etanol e 1,0 mL de água destilada (correspondente a 12,0 mg de etanol);
- B: 5,0 mL de água destilada.

Nessas soluções, adicionou-se por meio da parede do tubo de ensaio 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente. Após um minuto, adicionou-se 1,0 mL da solução de dicromato de potássio e então utilizou-se agitador, da marca MARCONI (modelo MA-162/1), para agitação das amostras.

O mesmo procedimento foi empregado para as amostras destiladas, as quais foram preparadas em triplicata, para realização da leitura da absorbância, utilizando-se 0,020 mL destas, diluídas para 5,0 mL.

As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, para leitura em espectrofotômetro UV-Vis, da marca Spectrum (modelo SP 2000 UV). Em cubetas de quartzo de 1 cm<sup>3</sup> foram adicionados 1,0 mL de cada solução para leitura da absorbância em comprimento de onda de 600 nm.

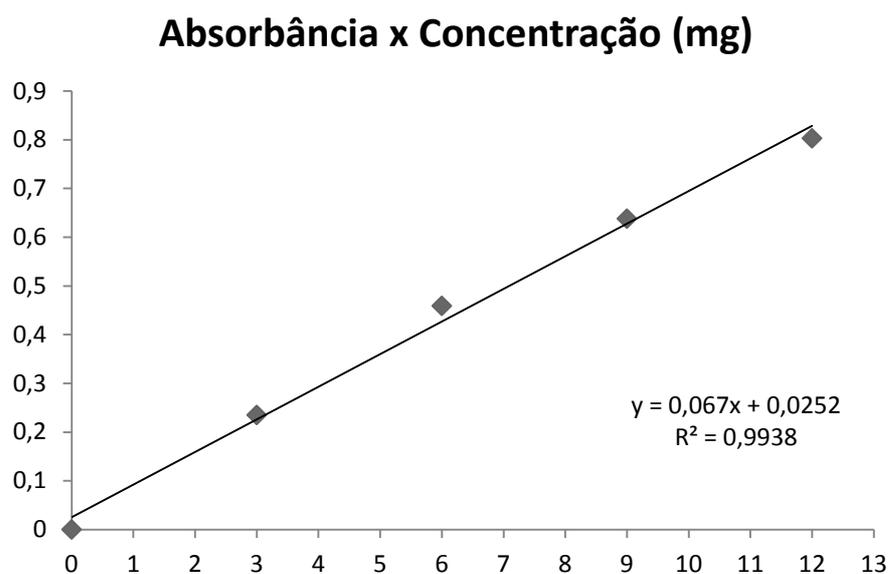
Por meio da equação da reta (Equação 4) obtida na curva de calibração (Figura 8) e a leitura das absorbâncias apresentadas pelas amostras destiladas, calculou-se os teores alcoólicos apresentados por cada uma destas em miligrama (mg) de álcool.

$$y = 0,067 X + 0,0252 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

y = absorbância

x = concentração de etanol em mg



**Figura 8.** Curva de calibração para determinação do teor alcoólico

Levando-se em consideração que  $x$  é igual ao  $E'$ , para encontrar os valores do teor alcoólico em °GL (Gay-Lussac), ou seja, em porcentagem de álcool, é necessário realizar os cálculos das equações 5 e 6, que seguem:

$$E = \frac{5000 \times E'}{0,7834 \times 1000} \quad \text{Equação 5}$$

ou

$$E = 6,323 \times E' \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

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

$E'$  = miligrama de etanol na amostra, de acordo com o cálculo da curva-padrão

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

1000 = fator de conversão de miligrama para grama

0,78934 = densidade do etanol a 20°C, em g/mL

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos no presente estudo foram obtidos em duplicata ou triplicata e foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), sendo reportados na forma de média e desvio padrão. As médias foram submetidas ao teste de comparação de médias, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As superfícies de resposta e gráficos de Pareto foram gerados pelo programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Matéria-prima

Por meio do processamento da matéria-prima, ou seja, da batata-doce ralada obteve-se uma massa de 6,066 kg, que após secagem em estufa apresentou valores de massa seca de 29,21%. O valor obtido para massa seca da amostra de batata-doce está em conformidade aos valores encontrados na literatura, sendo cerca de 30%, conforme descrito por Silva *et al* (2008); 30,92% de acordo com Roesler *et al.* (2008); 32,27% encontrado por Leonel e Cereda (2002). Elevados teores de massa seca implicam diretamente na quantidade de carboidrato com potencial de ser convertido em álcool, aumentando, portanto, o rendimento por unidade de peso e conseqüentemente por unidade de área, possibilitando assim maiores ganhos econômicos com a cultura.

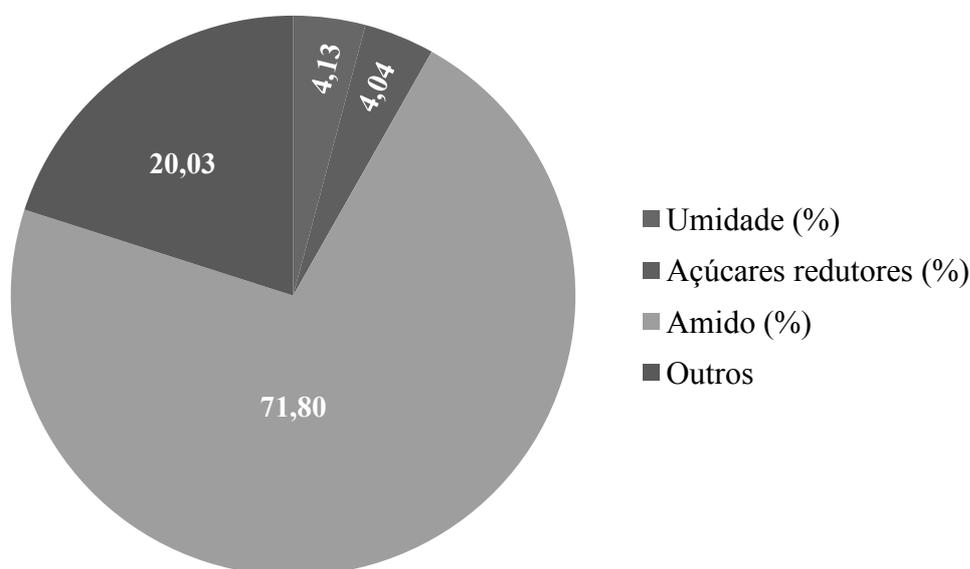
Do processamento em moinho, obteve-se 1,710 kg de farinha de batata-doce que foi armazenada em frasco de vidro, envolto por papel alumínio (Figura 9) sob refrigeração de 10 °C, para prevenção da oxidação desta.



**Figura 9.** Armazenamento da farinha de batata-doce preparada

### 5.1.1. Umidade

Calculando-se o percentual de umidade presente na farinha de batata-doce, por meio de quintuplicata encontrou-se o valor de  $4,13 \pm 0,70$ . Borba *et al.* (2005) determinou 8,7% de umidade em seus estudos, comprovando que a umidade encontrada para a farinha utilizada mostrou-se satisfatória. As matérias-primas para processamento não devem ultrapassar valores de umidade superiores a 15,0% (ANVISA, 2005), pois podem influenciar na atividade enzimática ou na hidrólise ácida. A variação na umidade pode ocorrer em função do processamento, tempo de secagem e, principalmente pela forma de armazenamento. Na Figura 10 encontram-se representadas as porcentagens dos teores de umidade, açúcar redutor e amido, atribuídos à farinha de batata-doce utilizada na presente pesquisa.



**Figura 10.** Porcentagem de umidade, açúcares redutores e amido, presentes na farinha de batata-doce

### 5.1.2. Açúcares Redutores

O valor de açúcares redutores obtidos na farinha de batata doce ( $4,04 \pm 0,74$  %) (Figura 10) está pouco abaixo dos padrões comumente observados na literatura. Leonel e Cereda (2005) encontraram 5,74%. Silva *et al* (2008) estabeleceram valores de 4,8 a 7,8 %, porém sem especificar a cultivar pesquisada. Estes teores são variáveis em decorrência de fatores como cultivar, época de cultivo, nutrição e mesmo tempo de armazenamento, tendo

em vista que, naturalmente, o amido presente vai sendo convertido em açúcares. Quanto maior for a conversão, maior será o rendimento de álcool, com menor custo benefício, considerando a não necessidade efetiva de grandes quantidades de enzimas hidrolíticas, como as amilases e glucosidases (STROPARO *et al* 2012).

Neste método titulométrico, o tartarato de sódio e potássio forma um sal com o  $\text{Cu}^{+2}$  (azul anil), o qual sofre posterior redução a tartarato e óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ , de coloração vermelho-tijolo), então o açúcar redutor é oxidado formando um sal sódico como produto (TAVARES *et al.*, 2010).

### **5.1.3. Amido**

O valor ( $71,80 \pm 1,32$  %) obtido na farinha de batata-doce está em consonância ao especificado na literatura, 58,1% estabelecido por Borba, Sarmiento e Leonel (2005) e 96,66% apresentado por Leonel, Jackey e Cereda [1998?], considerando-se um valor médio entre os autores citados.

A quantificação do amido presente na matéria-prima utilizada é de extrema importância no processo de obtenção de álcool, tendo em vista que a quantidade de açúcares obtidos do mesmo por meio da hidrólise é diretamente proporcional ao rendimento do produto esperado. A hidrólise do amido é realizada mediante quebra dos polímeros de amilose e amilopectina em unidades individuais de maltose convertidas por meio da via glicolítica em Piruvato, que na ausência de oxigênio é fermentado em álcool, com liberação de água e  $\text{CO}_2$ .

O amido proveniente da batata-doce necessita de três processos para que possa ser realizada sua fermentação, sendo estes a gelatinização, solubilização e hidrólise.

O processo de gelatinização, o qual hidrata os grânulos, consiste em aquecer o tecido contendo amido em água ou etanol ferventes, facilitando assim o acesso dos reagentes de solubilização e hidrólise do polímero. Conseqüentemente, levando à destruição de sua cristalinidade e ordem molecular devido ao rompimento de ligações de hidrogênio que inicialmente, mantinham sua integridade (MANNERS, 1985; MALI, GROSSMANN e YAMASHITA, 2010).

## **5.2. Fermentação**

A eficiência da fermentação influencia o consumo de toda a energia gasta durante o

processo de obtenção do etanol, revelando assim, a necessidade de leveduras industriais que apresentem elevado desempenho durante a fermentação (FERRARI, GUIGOU e LAREO, 2013).

Testes pilotos foram realizados até que se obtivessem os melhores resultados para a realização do estudo no presente trabalho.

### **5.3. Teor alcoólico**

Para a determinação do teor alcoólico foi utilizada a curva de calibração que forneceu a equação da reta  $y = 0,067 X + 0,0252$ , com  $R^2 = 0,9938$ .

Os valores de teor alcoólico apresentado por cada amostra, utilizando os diferentes tipos de hidrólises, bem como o delineamento fatorial utilizado, encontram-se representados na Tabela 3.

A fermentação realizada com a hidrólise ácida apresentou maiores valores de teor alcoólico, destacando-se as amostras de números 13, 14, 15 e 16, de valores médios: 25,619; 24,990; 26,531; 26,311, respectivamente. Sendo que as amostras 13 e 14 foram fermentadas com pH 4,0 e temperatura de 36°C, por um período de 120 horas (5 dias). As amostras 15 e 16 foram fermentadas com pH 5,0, sob mesma temperatura das amostras anteriores, durante o mesmo período.

Os maiores valores de teor alcoólicos (%) encontrados para as amostras fermentadas por meio da hidrólise enzimática, também são os referentes às amostras 13, 14, 15 e 16. Sendo estes, respectivamente: 23,86; 24,58; 25,02; 25,05.

Na Tabela 3 tem-se o delineamento fatorial para estudo da formação do álcool obtido por meio das hidrólises ácida e enzimática, constando os níveis codificados e os valores dos níveis reais utilizados para o ensaio de cada amostra.

A produção de etanol tanto por meio da hidrólise ácida quanto pela hidrólise enzimática da batata-doce apresentou diferença estatística (IC = 95%), tanto para as linhas da Tabela 3, quanto para as colunas.

Levando-se em consideração a significância de 95%, nota-se que para a hidrólise ácida os ensaios de números 1 e 3, possuindo níveis iguais para as variáveis pH e tempo, não diferiram significativamente; assim como não diferiram os ensaios 2 e 4, apresentando níveis iguais aos anteriores.

Já para o teor alcoólico da hidrólise enzimática, os ensaios 2 e 9, que possuem os três níveis diferentes entre si não diferiram significativamente; para os ensaios 5 e 6, com níveis

iguais para temperatura e tempo, também não observou-se diferença significativa; bem como para o 7 e 8, os quais ainda destacaram-se no percentual alcoólico apresentado por suas amostras.

Analisando-se as linhas, pode-se observar que os ensaios 1, 2, 3, 7 e 11 não diferiram significativamente entre o tipo de hidrólise realizada. Sendo que os ensaios 1, 2 e 3 fermentaram durante cinco dias, evidenciando novamente que quanto maior o período de fermentação, maior é o volume de álcool obtido.

Os ensaios que apresentaram menores porcentagens de álcool foram o 2 para a hidrólise ácida e o 4 para a hidrólise enzimática, com percentuais de 15,41 e 13,96, respectivamente. Ambos foram realizados com pH 5, durante o período de um dia, o que demonstra que quanto menor o período de fermentação, menos álcool é produzido no processo fermentativo.

Ambos os resultados dos ensaios 7 e 8 apresentaram os maiores teores de álcool obtido, tanto na hidrólise ácida (25,30 e 26,42, respectivamente) quanto na enzimática (24,22 e 25,04, respectivamente), sendo que esses resultados não diferiram entre si, e o ensaio 7 não diferiu entre o tipo de hidrólise utilizada.

**Tabela 3.** Delineamento fatorial para estudo da formação de álcool obtido por hidrólise ácida e hidrólise enzimática de batata-doce.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais			Teor alcoólico HA (%)	Teor alcoólico HE (%)
	pH	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (dias)		
1	-1	-1	-1	4,00	20,00	1,00	16,72 ± 0,45 fg A	17,25 ± 1,11 cde A
2	+1	-1	-1	5,00	20,00	1,00	15,41 ± 0,29 g A	15,47 ± 0,02 ef A
3	-1	+1	-1	4,00	36,00	1,00	16,86 ± 0,33 fg A	16,20 ± 0,07 de A
4	+1	+1	-1	5,00	36,00	1,00	16,43 ± 1,47 g A	13,96 ± 0,82 f B
5	-1	-1	+1	4,00	20,00	5,00	21,94 ± 0,40 cd A	20,71 ± 0,18 b B
6	+1	-1	+1	5,00	20,00	5,00	23,43 ± 0,38 bc A	21,94 ± 1,11 b B
7	-1	+1	+1	4,00	36,00	5,00	25,30 ± 0,45 ab A	24,22 ± 0,51 a A
8	+1	+1	+1	5,00	36,00	5,00	26,42 ± 0,16 a A	25,04 ± 0,02 a B
9	0	0	0	4,50	28,00	3,00	20,32 ± 0,07 de A	15,69 ± 0,30 ef B
10	0	0	0	4,50	28,00	3,00	19,78 ± 0,43 e A	18,10 ± 0,07 cd B
11	0	0	0	4,50	28,00	3,00	18,53 ± 0,07 ef A	18,43 ± 0,03 c A

NOTA: Os resultados obtidos estão apresentados na forma de média ± desvio padrão (n=2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente (p<0,05). Faixa estudada: pH: 4,00 a 5,00; temperatura: 20,00 a 36,00 °C; tempo: 1 a 5 dias; teor alcoólico expresso em % de álcool etílico. HA = hidrólise ácida. HE = hidrólise enzimática.

Woiciechowski *et al.* (2002) analisou a recuperação de açúcares redutores presentes no bagaço da mandioca utilizando hidrólises ácida e enzimática. O rendimento da hidrólise ácida foi de 62,4 g de açúcar redutor a partir de 100 g do bagaço de mandioca, contendo 66% de amido, representando 94,5% de açúcar redutor recuperado. Já o rendimento da hidrólise enzimática foi de 77,1 g de açúcar redutor a partir de 120 g de bagaço de mandioca, representando 97,3% de recuperação de açúcares redutores. Com relação ao tempo, uma batelada de hidrólise ácida necessitou 10 minutos, mais o tempo para aquecer e esfriar o reator e uma batelada de hidrólise enzimática necessita de 25 horas e 20 minutos, mais o tempo para aquecer e esfriar o reator. Assim, como no presente trabalho, a hidrólise ácida mostrou-se muito mais rápida, despendendo muito menos tempo, fazendo com que essa se sobressaia à enzimática, já que se podem realizar muitas hidrólises ácidas durante o período de uma hidrólise enzimática. Outro fator muito importante relacionado à hidrólise ácida é seu custo, o qual é menor se comparado ao método enzimático.

Melo *et al.* (2008) produziu etanol a partir de hidrolisado de torta de mamona. A hidrólise ácida foi realizada utilizando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , relação sólido:líquido de 1:6, sob temperatura de 120°C, durante período de 40 minutos, gerando um meio fermentativo de 27 g  $\text{L}^{-1}$  de açúcares redutores (eficiência de hidrólise = 32%). O produto foi fermentado, obtendo-se 11 g  $\text{L}^{-1}$  de etanol (produtividade volumétrica = 1,38 g  $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  e rendimento de etanol no substrato consumido = 0,45 g  $\text{g}^{-1}$ ). No presente estudo, obteve-se 4,18 g  $\text{L}^{-1}$  de etanol no ensaio que apresentou maior percentual alcoólico, valor menor que o citado anteriormente, o que pode ser atribuído aos mecanismos de quebras diferentes dos ácidos.

Curvelo-Santana *et al.* (2010) produziu álcool de mandioca por meio de hidrólise enzimática do amido da mandioca com  $\alpha$ -amilase de *A. niger*. Os ensaios foram realizados em pH 4,8, variando a concentração do amido (7-22 g  $\text{L}^{-1}$ ) e temperatura (30-59,1°C). O mosto de fermentação continha entre 2,2 e 5% de amido de mandioca. Os resultados para a hidrólise mostraram que as condições ótimas foram entre 55 e 59,1°C, com concentração entre 7,9 e 10 ou 20 e 22 g  $\text{L}^{-1}$ , hidrolisando 80% do amido. A melhor condição para a fermentação foi obtida com mosto contendo 5% de amido. Sua composição final foi de 0,668 g  $\text{L}^{-1}$  de açúcares redutores totais, 0,572 g  $\text{L}^{-1}$  de açúcares redutores, 3,71 °GL. O rendimento alcoólico obtido foi de 45%. Ao se comparar com a presente pesquisa, obteve-se elevados teores alcoólicos, já que o ensaio que apresentou menor teor foi 13,96°GL.

A Correlação de Pearson foi aplicada aos resultados obtidos, e verificou-se uma correlação de 92,90%, ou seja, uma correlação positiva forte entre os valores de álcool obtidos por hidrólise ácida e por hidrólise enzimática (Tabela 3). Na Tabela 4, estão os valores atribuídos às correlações positiva e negativa, podendo-se confirmar a correlação positiva forte (92,90%) apresentada pelo presente trabalho.

**Tabela 4.** Valores referentes à Correlação de Pearson, adaptado de Barbetta (2006).

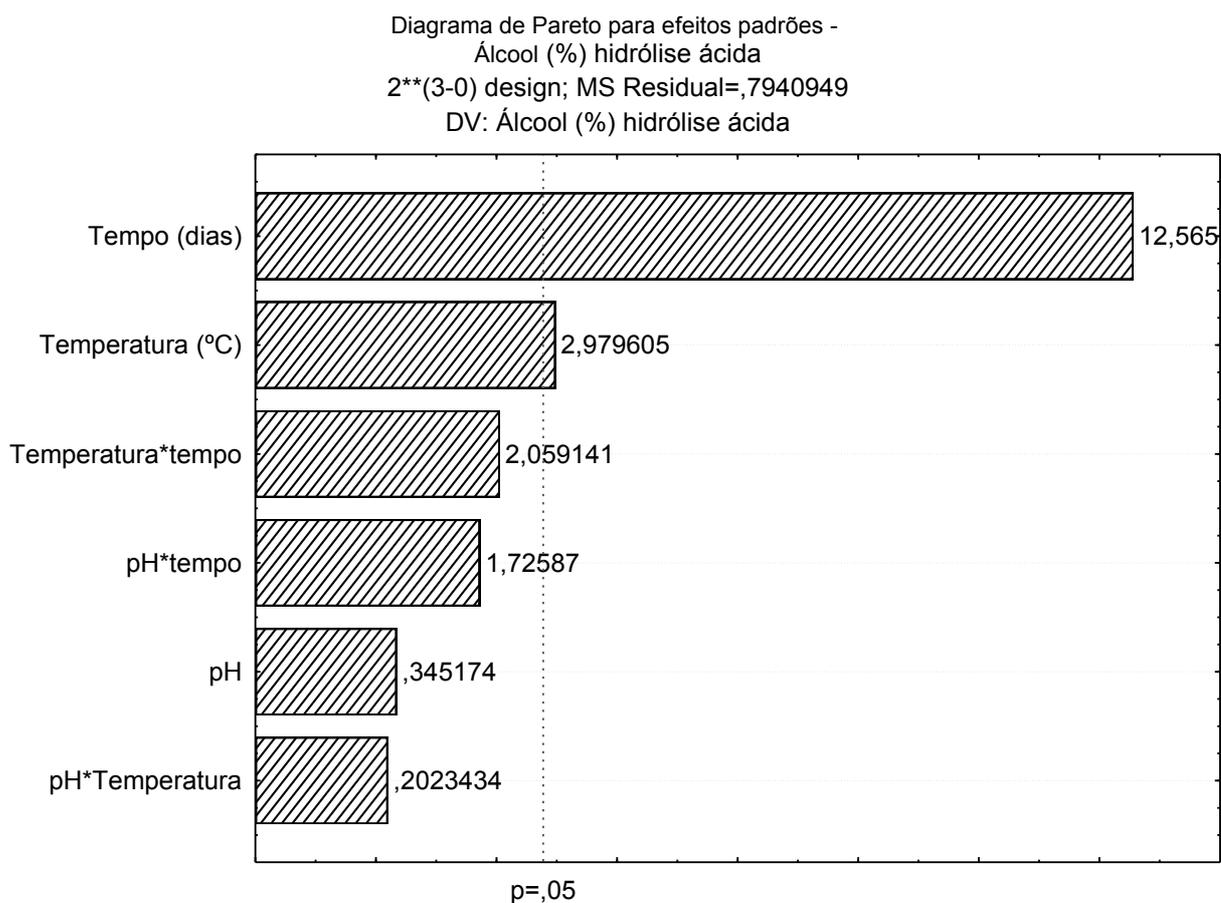
	Correlação positiva	Correlação negativa
Forte	0,70 a 1,00	-0,70 a -1,00
Moderada	0,30 a 0,70	-0,30 a -0,70
Fraca	0 a 0,30	0 a -0,30

Com base nos dados obtidos na Análise de Variância (ANOVA), obteve-se o modelo final (Equação 7) utilizando como resposta a produção de etanol via hidrólise ácida (HA) em função do pH, temperatura (T) e tempo (t) de fermentação.

$$\text{Álcool (HA)} = 20,10 + 0,11 \text{ pH} + 0,93 \text{ T} + 3,96 \text{ t} + 0,06 \text{ pH} \cdot \text{T} + 0,54 \text{ pH} \cdot \text{t} + 0,64 \text{ T} \cdot \text{t}$$

**(Equação 7)**

No Diagrama de Pareto, representado pela Figura 11, observa-se que os coeficientes lineares do tempo e da temperatura foram significativos para a produção de álcool por meio da hidrólise ácida.



**Figura 11.** Diagrama de Pareto para efeitos padrões – Álcool HA

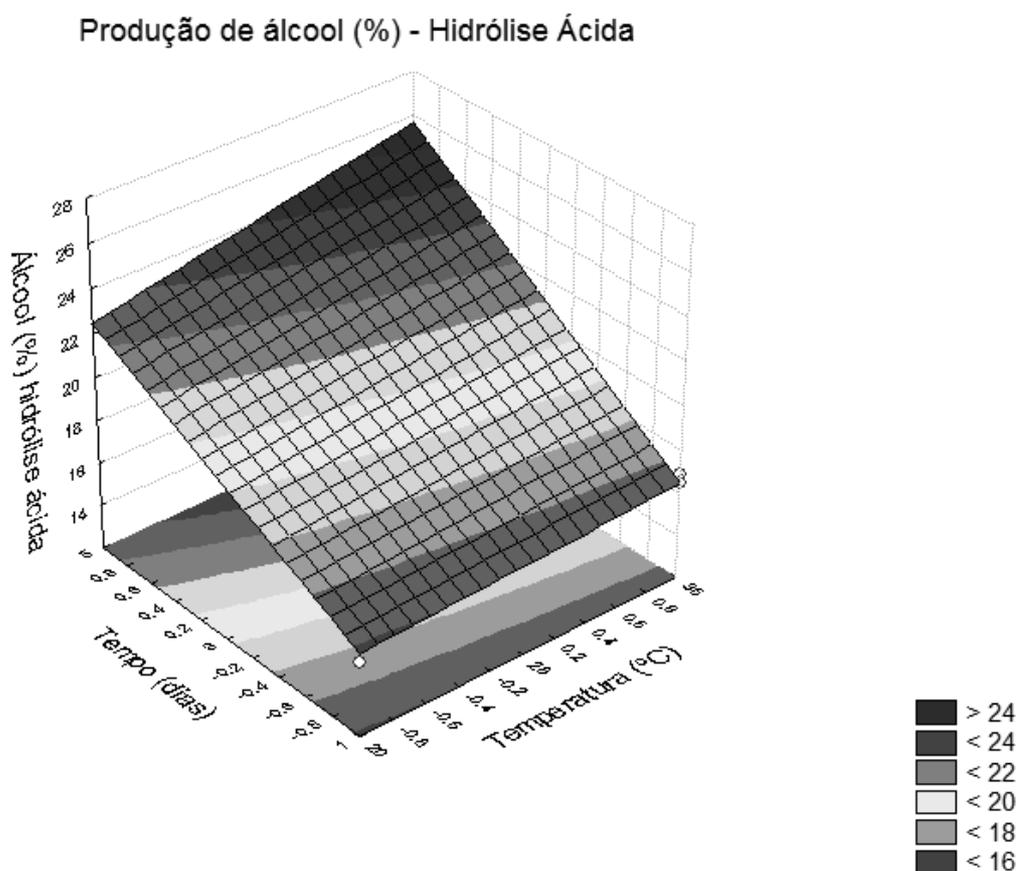
Na Tabela 5 estão os dados obtidos na Análise de Variância para a produção de álcool por meio de hidrólise ácida em função do pH, tempo e temperatura.

**Tabela 5.** Análise de variância da produção de álcool de batata-doce por meio de hidrólise ácida em função do pH, tempo e temperatura.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado	R <sup>2</sup>
Modelo	2	141,46	70,73	178,50	4,46	0,9775
Resíduo	8	3,17	0,40	-	-	-
Total	10	144,63	-	-	-	-

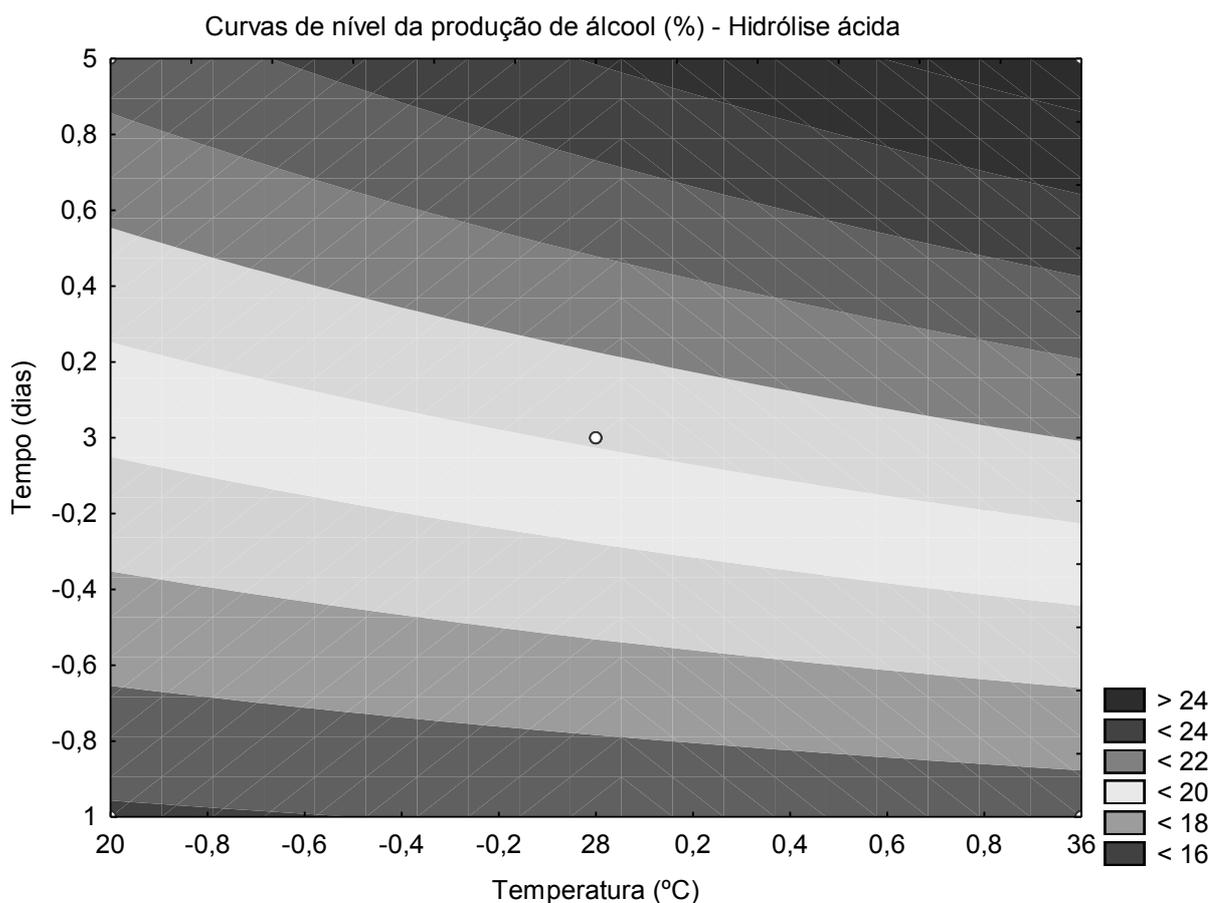
O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança ( $F_{\text{calculado}}$  superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ ) com  $R^2$  igual a 0,9775, evidenciando que o modelo pode explicar 97,75% da variabilidade dos dados experimentais (Tabela 4).

A superfície de resposta linear representada pela Figura 12 evidencia a interação dos efeitos de tempo e temperatura no processo de obtenção do álcool, via hidrólise ácida. A região que apresenta maiores valores de percentual alcoólico corresponde ao aumento de temperatura e período de fermentação.



**Figura 12.** Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise ácida em função da temperatura e do tempo

As Figuras 12 e 13 confirmaram a análise de efeitos da variação da resposta para ambos as variáveis estudadas, tempo e temperatura. As curvas de nível (Figura 14) foram geradas por meio do modelo proposto pela Equação 7. Na Figura 14 é possível observar na região mais escura, os maiores valores de teor alcoólico, os quais estão relacionados, conseqüentemente, ao aumento de temperatura e principalmente de tempo de fermentação.



**Figura 13.** Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise ácida em função da temperatura e do tempo

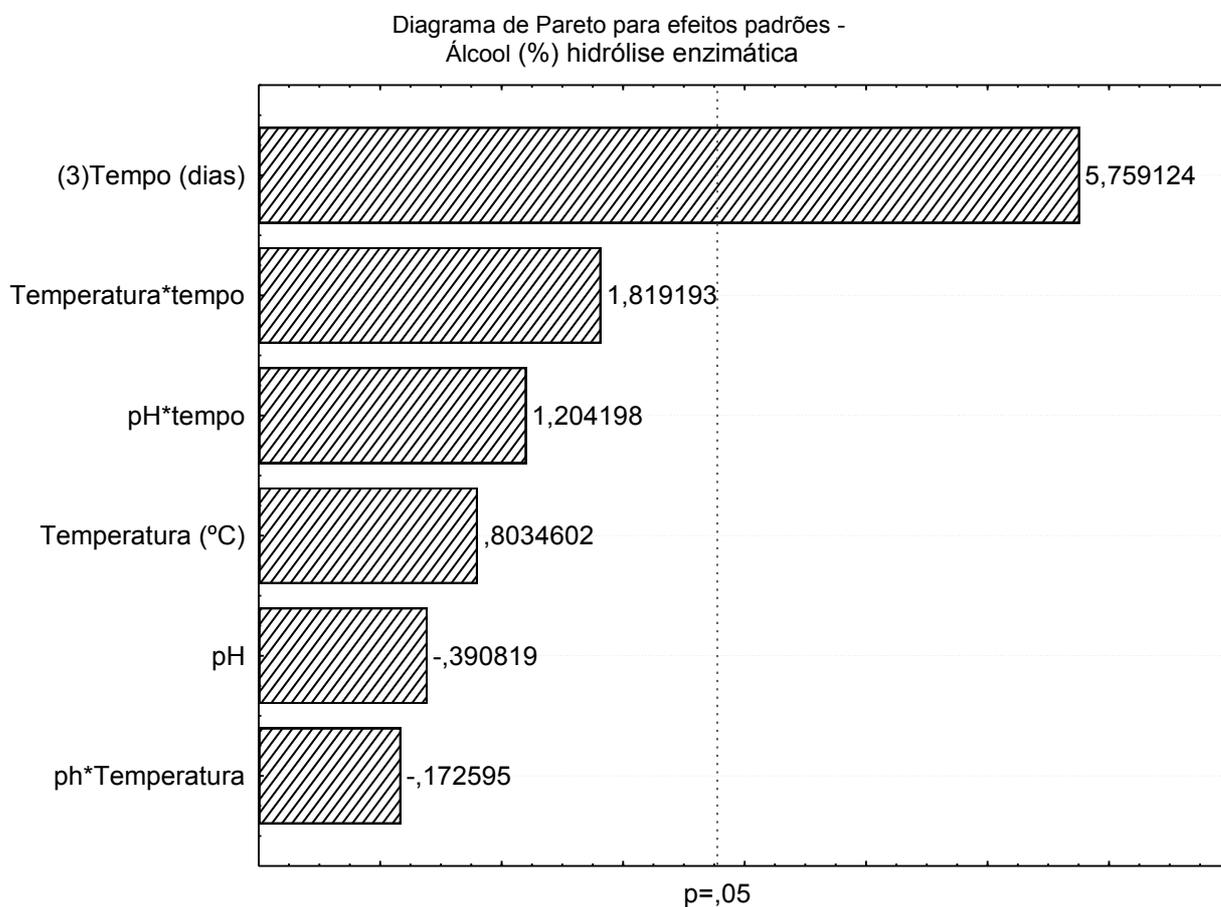
Poonsrisawat *et al.* (2014) produziram etanol a partir da mandioca realizando sacarificação simultânea a fermentação do mosto de raiz pré-tratado (32% sólido inicial) com *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando processo de liquefação de alta temperatura e processo convencional com amido cru, sob temperatura de 32°C por 96 horas, obtendo concentrações finais de etanol de 19,65 e 17,54% (v/v), respectivamente. Assim como comprovado para a hidrólise ácida realizada, no trabalho de Poonsrisawat *et al.* (2014) a temperatura também apresentou significância no teor alcoólico. Os valores de percentual de álcool produzidos condizem com os percentuais de álcool apresentados no presente estudo, principalmente se comparados os percentuais de amido presente na raízes da mandioca [82,5%, conforme Cereda e Vilpoux, (2003)] e da batata-doce (76,37%, de acordo com Leonel, Jackey e Cereda [1998?]).

Com base nos dados obtidos na Análise de Variância (ANOVA), obteve-se o modelo final (Equação 8) utilizando como resposta a produção de etanol via hidrólise enzimática (HE) em função do pH, temperatura (T) e tempo (t) de fermentação.

$$\text{Álcool (HE)} = 18,82 - 0,25 \text{ pH} + 0,51 \text{ T} + 3,63 \text{ t} - 0,11 \text{ pH} \cdot \text{T} + 0,76 \text{ pH} \cdot \text{t} + 1,15 \text{ T} \cdot \text{t}$$

**(Equação 8)**

No Diagrama de Pareto, representado pela Figura 14, observa-se que o coeficiente linear do tempo foi significativo para a produção de álcool por meio da hidrólise enzimática.



**Figura 14.** Diagrama de Pareto para efeitos padrões – Álcool HE

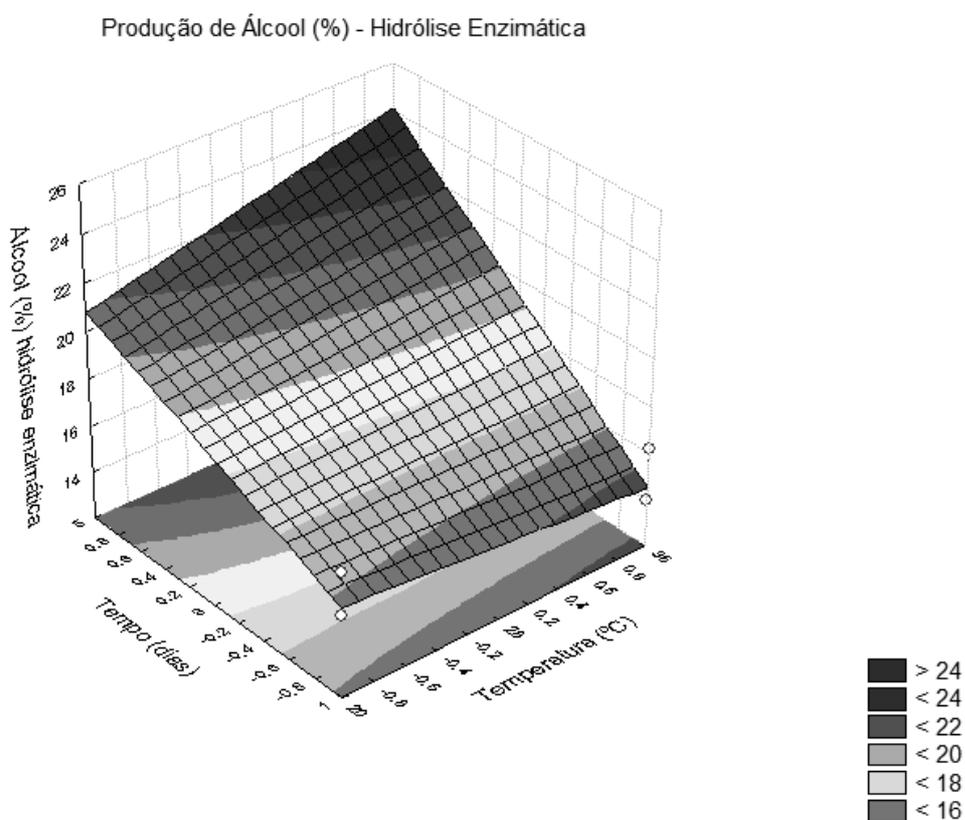
Na Tabela 6 estão os dados obtidos na Análise de Variância para a produção de álcool por meio de hidrólise enzimática em função do pH, tempo e temperatura.

**Tabela 6.** Análise de variância da produção de álcool de batata-doce por meio de hidrólise enzimática em função do pH, tempo e temperatura.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado	R <sup>2</sup>
Modelo	1	138,28	138,28	391,81	5,12	0,9064
Resíduo	9	3,18	0,35	-	-	-
Total	10	141,46	-	-	-	-

O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança ( $F_{\text{calculado}}$  superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ ) com  $R^2$  igual a 0,9064, evidenciando que o modelo pode explicar 90,64% da variabilidade dos dados experimentais (Tabela 3).

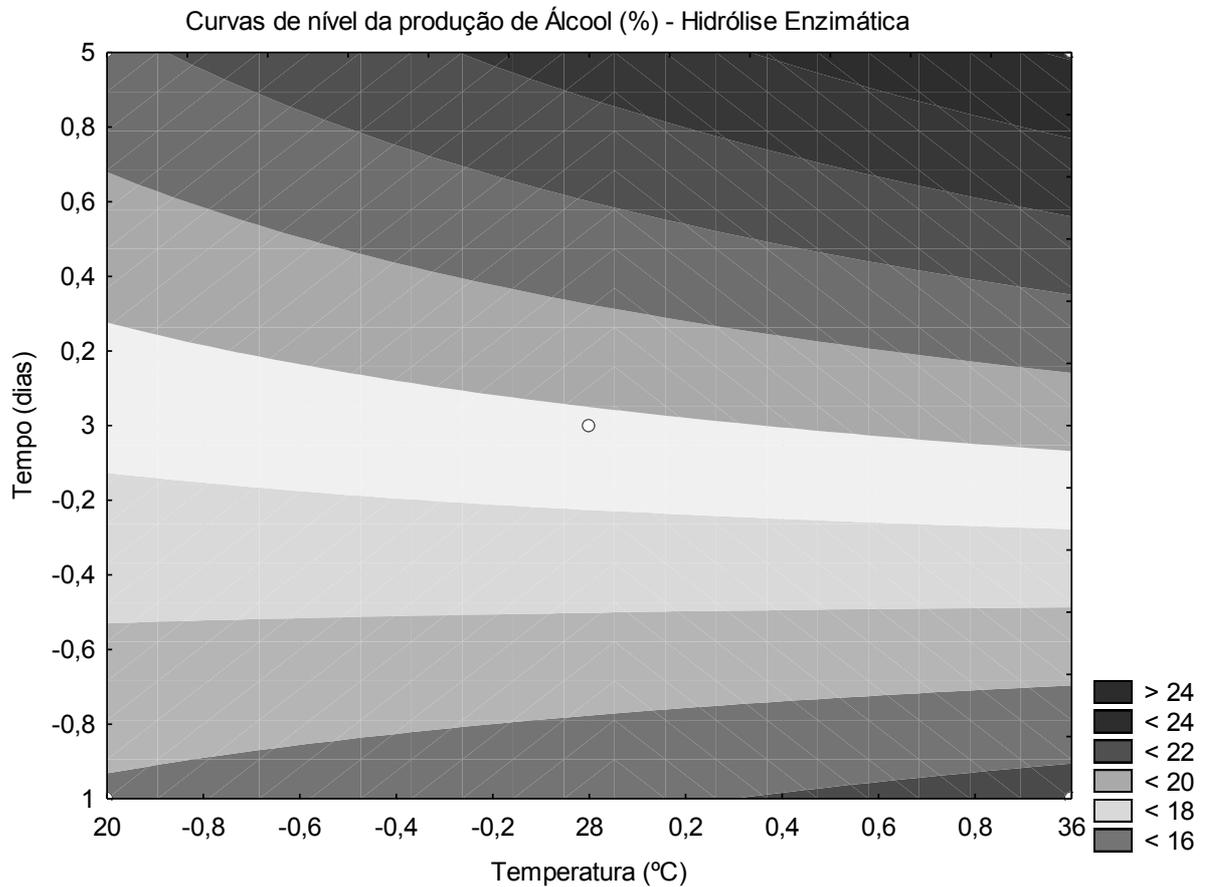
Na Figura 15 encontra-se representada a superfície de resposta linear e na Figura 17 as curvas de nível da produção de álcool por hidrólise enzimática, ambas em função do tempo e da temperatura.



**Figura 15.** Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e da temperatura

Observando-se a superfície de resposta da Figura 15, bem como as curvas de nível da Figura 16, nota-se que há maior produção de álcool via hidrólise enzimática, na região de cores mais escuras, representada pelos maiores valores do fator tempo, confirmando assim, a análise de efeitos.

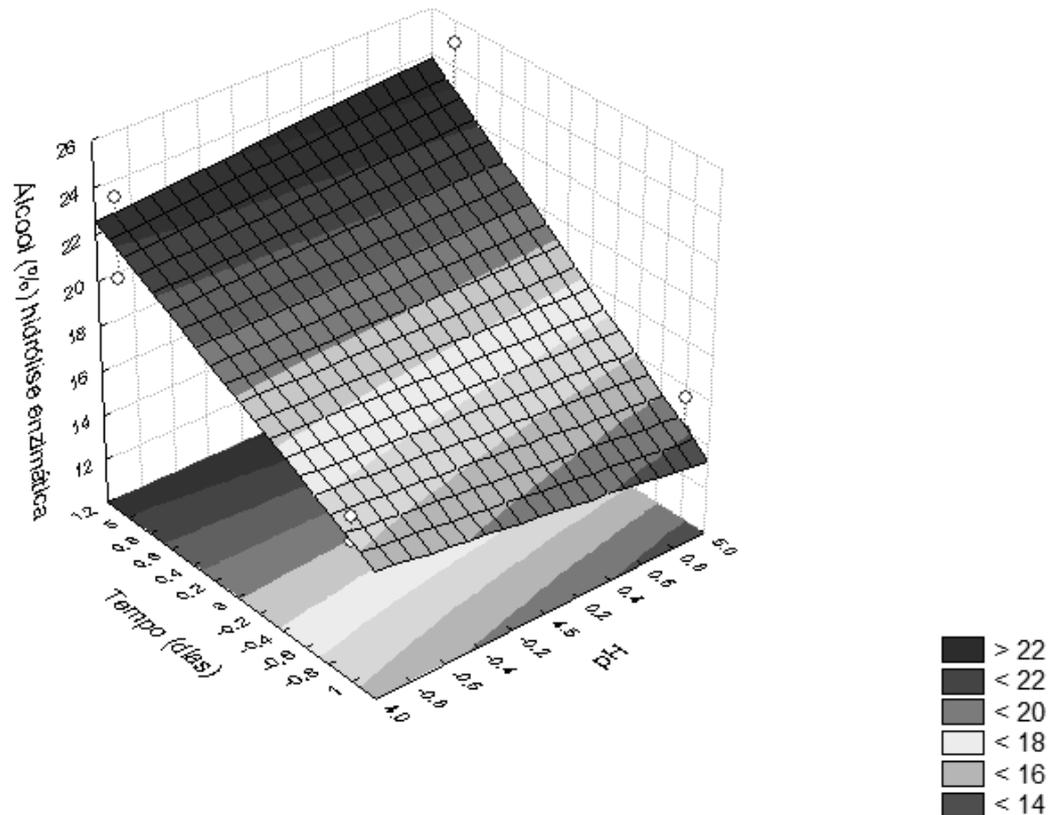
Srichuwong *et al.* (2012) estudou a produção de bioetanol de batata-doce, obtendo rendimentos de 15,1 e 15,4% (v/v), ou seja, 88,8 e 90,6% do rendimento teórico previsto, durante período de 48 e 72 horas. Confirmando a importância do tempo no processo fermentativo, pois o período de 72 horas apresentou maior teor alcoólico, assim como no presente trabalho.



**Figura 16.** Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e da temperatura

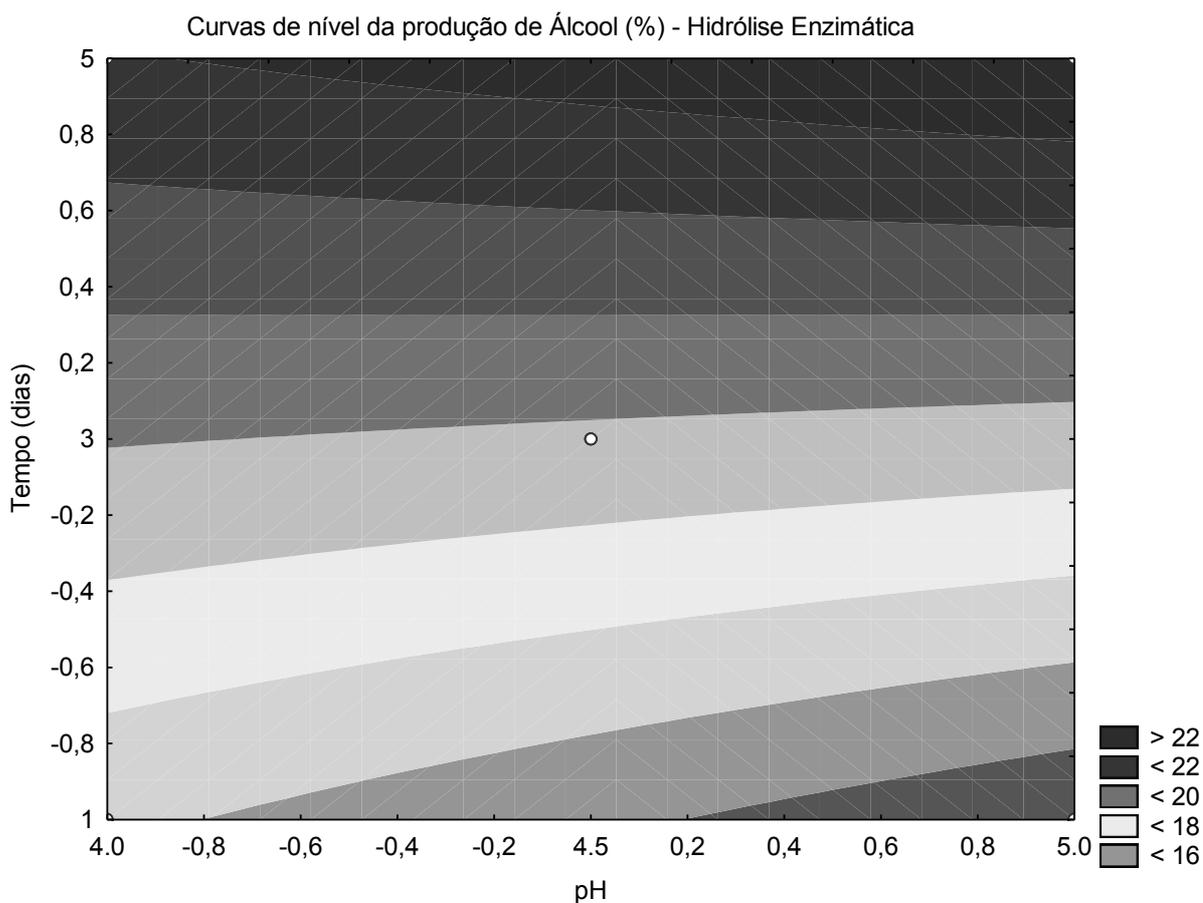
A superfície de resposta linear (Figura 17) e as curvas de nível (Figura 18) foram geradas por meio do modelo proposto para a obtenção de álcool segundo os parâmetros de tempo (dias) e pH.

### Produção de Álcool (%) - Hidrólise Enzimática



**Figura 17.** Superfície de resposta linear da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e do pH

Ao observar-se a superfície de resposta linear (Figura 17) e as curvas de nível (Figura 18), pode-se confirmar a análise de efeitos realizada. A região onde são observados os maiores valores para o teor de álcool produzido é a que apresenta maiores valores relacionados ao fator tempo, ou seja, dos ensaios realizados com maior tempo de duração, confirmando mais uma vez que quanto maior o tempo de fermentação, maior o percentual de álcool produzido.



**Figura 18.** Curvas de nível da produção de álcool de batata-doce por hidrólise enzimática em função do tempo e do pH

As superfícies de resposta representadas pelas Figuras 16, 17, 18 e 19 indicam que com o aumento do tempo de fermentação o teor de álcool tende a aumentar, indicando o melhor caminho para se obter um maior teor de álcool por meio de hidrólise enzimática da batata-doce.

## 6. CONCLUSÃO

A caracterização da farinha de batata-doce utilizada nos experimentos apresentou percentuais satisfatórios com relação a açúcares redutores, amido e umidade. Estando esta última de acordo com os valores exigidos pela legislação vigente (ANVISA, 2005).

As condições de fermentação que se mostraram significativas para a hidrólise ácida foram a temperatura e o tempo. Contudo, para a hidrólise enzimática somente o tempo de fermentação se mostrou significativo. Logo, observa-se que para ambas as hidrólises utilizadas, quanto maior o tempo de fermentação maior o percentual de álcool obtido.

Os maiores valores de percentuais alcoólicos foram obtidos por amostras de destilados que fermentaram nas condições de temperatura de 36 °C, durante cinco dias de fermentação.

Na referida condição de 36 °C de temperatura e período de fermentação de cinco dias, a hidrólise ácida foi mais eficiente para a produção de álcool que a enzimática, e ainda, esta (HA) representa uma alternativa viável do ponto de vista econômico.

## REFERÊNCIAS

ABAM, Associação brasileira dos produtores de amido de mandioca. **Etanol de mandioca atrai investimentos**. Disponível em: [www.abam.com.br](http://www.abam.com.br). Acesso em 30 de setembro de 2010.

ABNT. Associação Nacional de Normas Técnicas. **NBR 13920**. 1997.

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

AMARAL, L. I. V. *et al.* **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais**. São Paulo: Hoehnea, 2007. 34 (4). p. 425-431.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 263, de 17 de outubro de 2005. **Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1ae52c0047457a718702d73fbc4c6735/RDC\\_263\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1ae52c0047457a718702d73fbc4c6735/RDC_263_2005.pdf?MOD=AJPERES) > Acesso em: 15 jul. 2015.

APAR, D. K., OZBEK, B., **Alfa-Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process**. Process Biochemistry, Esenler, Istanbul, 2003. v. 39, n. 12, p. 1877 – 1892.

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

BARBETTA, P. A. **Estatística Aplicada às Ciências Sociais**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2006. 315 p.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** (1989) 40: 95-117.

BORBA, A. M.; SARMENTO, S. B. S.; LEONEL, M. Efeito dos parâmetros de extrusão sobre as propriedades funcionais de extrusados da farinha de batata-doce. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(4): 835-843, out.-dez. 2005.

BRADBURY, J. H. **Chemical composition of tropical roots crops and its implication for nutrition.** In: EIGHTH SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, Bangkok, 1990. p. 159-170.

CANOVA, M. D. **Biocombustíveis: análise de viabilidade econômica da implantação de microdestilarias de etanol no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRGS, 2011.

CASTRO, L. A. S. et al. **Acessos de Batata-Doce do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado Recomendados para Mesa e Processamento Industrial.** Pelotas: EMBRAPA, 2009. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/749188>> Acesso em: 15 dez. 2012.

CEREDA, M. P. et al. **Propriedades gerais do amido.** Campinas: Fundação Cargill, 2001.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v. 3, 711 p.

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

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(3): 613-617, jul.-set. 2010.

DEMIATE, I. M. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. Publicatio UEPG – Exact and Soil Sciences, **Agrarian S. and engineering**, 8(1): 65-78, 2002.

ELIASSON, A.C. **Starch in food – Structure, function and applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004. 605p.

ELLIS, R.P. *et al.* Starch production and industrial use (Review). **Journal of Science Food and Agriculture**. London, v.77, n.3, p. 289-311, 1998.

EMBRAPA. **Batata-doce (*Ipomoea batatas*) – Composição e uso**. Embrapa Hortaliças - Sistemas de Produção, 6. ISSN 1678-880X. Versão Eletrônica: jun 2008. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce\\_Ipomoea\\_batatas/composicao\\_uso.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce_Ipomoea_batatas/composicao_uso.html)> Acesso em: 30 jun 2015.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis. Ano 2012**. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>> Acesso em: 17 abr 2014.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional – 2015. Relatório síntese – ano base 2014**. Disponível em: <[https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final\\_2015\\_Web.pdf](https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final_2015_Web.pdf)> Acesso em: 07 jul 2015.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Guia de Referência para o Encaminhamento de projetos de Produção e Uso de Biodiesel e Etanol ao Mecanismo de Desenvolvimento Limpo – MDL**. [?] Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>> Acesso em: 17 abr 2014.

FELTRAN, J. C; VALLE, T. L. **Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam): matéria-prima alternativa para a produção de etanol**. Campinas: Instituto Agrônômico – Centro de Horticultura, [2008?].

FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; LAREO, C. Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato. Elsevier, 2013. **Bioresource Technology** 136. p. 377–384.

FERREIRA, S. M. *et al.* Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. Campina Grande: **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 2013. v.15. n.4. p. 383-390.

FREITAS, G. C. de. **Fermentação de diferentes fontes de amido por *Klebsiella oxytoca* etanológica**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais. 1999.

HAISSIG, B. E.; DICKSON, R. E. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. **Physiologia Plantarum** 47: 151-157. 1979.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

JUSUF, M.; GINTINGA, E. The Prospects and Challenges of Sweet Potato as Bio-ethanol Source in Indonesia. In: CONFERENCE AND EXHIBITION INDONESIA RENEWABLE ENERGY & ENERGY CONSERVATION [INDONESIA EBTKE CONEX 2013]. Elsevier, 2014. **Energy Procedia** 47. p. 173 – 179.

KEITT, T. E. **Sweet potato work in 1908**. North Carolina Agricultural Experimental Station. Bulletin, 146. 1909. 21 p.

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

LEE, W-S *et al.* Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. **Renew Energy** 2012, 39 (1): 216-22.

LEHMANN, U; ROBIN, F. Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. **Trends Food Sci. Technol.** 2007; 18: 346–55.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier: 2006. 4 ed.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 22(1): 65-69, jan.-abr. 2002.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M. P. **Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce - um estudo de caso.** [1998?]. Disponível em:

<[http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos\\_de\\_comunicacao/CTA/VOL18N3/CTA18N3\\_14.PDF](http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL18N3/CTA18N3_14.PDF)> Acesso em: 14 jul. 2015.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. **Biotechnologia Industrial.** v. 3. p. 1-43.

LOPES, A. C. **Produção de álcool de batata-doce em função do meio fermentativo.** Dissertação de mestrado em Bioenergia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, 2013. 83 p.

MACHADO, F. L. C.; CAMPOS, G.; SOUZA, M. T. G. Comparação entre os métodos de Lane-Eynon e polarimétrico para determinação de amido em farinha de mandioca. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, 68 (1): 155-9, 2009.

McARDLE, R.N.; BOUWKAMP, J.C. Potential of sweet potato as a feedstock for small scale fuel ethanol production. **Hortscience**, 1982. v.17, n.3, p.534.

McCREADY, R.M. Starch and Dextrin. In: M. Joslyn (ed.). *Methods in Food Analysis*. London: **Academic Press**, 1970. p. 541-563.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina**, Ciências Agrárias, 2010. v.31. n.1. jan.-mar. p. 137-156.

MANNERS, D. Starch. In: P. Dey & R. Dixon (eds.). **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**. London: Academic Press, 1985. p. 149-203.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agroenergia**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia>> Acesso em: 23 abr 2014.

MARINHO, A. V.; RODRIGUES, J. P. M.; SIQUEIRA, M. I. D. **Avaliação da acidez**

**volátil, teor alcoólico e de cobre em cachaças artesanais.** Estudos, Goiânia, v. 36, n. 1/2, p. 75-93, jan./fev. 2009.

MELO, W. C.; SILVA, D. B.; JR, N. P. Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos. **Química Nova**, 2008. v.31. n.5, 1104-1106.

MYERS, A.M. *et al.*. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology** 122: 989-997, 2000.

NEGRÃO. LCP; URBAN, MLP. Álcool como “commodity” internacional. **Economia e Energia**, nº 47, p. 8 – 18, 2005. Disponível em: <<http://ecen.com>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

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

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proalcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**. vol.11. n.2 (42). abr/jun. de 1991.

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

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Rendimento e qualidade de raízes de batata-doce adubada com níveis de uréia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.925-928, out-dez 2005.

OLORUNNISOMO, O. A.; ADEWUMI, M. K.; BABAYEMI, O. J. Effects of nitrogen level on the utilization of maize offal and sorghum brewer's grain in sheep diets. **Livestock Research for Rural Development**, 2006 v. 18. Article 10.

PAVLAK, M. C. M. **Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação de Mestrado em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, UFT, 2010.

PAVLAK, M. C. M. *et al.* Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, 2011. vol. 34. n. 1. p. 82-86.

POONSRISAWAT, A. *et al.* Redução de viscosidade de mandioca para muito elevada gravidade fermentação do etanol usando enzimas que degradam parede celular de *Aspergillus aculeatus*. **Process Biochemistry**, 2014. 49. p. 1950–1957.

ROESLER, P. V. S. O. *et al.* Produção e qualidade de raiz tuberosa de cultivares de batata-doce no oeste do Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, 2008. v. 30, n. 1, p. 117-122.

SACHS, Ignacy. **Os biocombustíveis estão chegando a maturidade**. Tradução Jones de Freitas. Democracia Viva, n. 29, 2005.

SERVINO, L. S. *et al.* Hidrólise enzimática do amido da batata doce. **Colloquium Agrariae**, vol. 7, n. Especial, jul–dez, 2011.

SHANAVAS, S. *et al.* Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. **Biomass Bioenergy** 2011; 35 (2): 901-9.

SILVA, J. A. *et al.* **Química Nova**, 2008. n. 31, 1073.

SILVA, J. B. C. da *et al.* **Cultivo da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ, 1995. 18 p. (EMBRAPA-CNPQ. Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças, 7).

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. **Cultura da Batata Doce**. EMBRAPA Hortaliças, 2008. Disponível em:  
<<http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>> Acesso em: 16 jun. 2015.

SILVA, J. C. **Performance agrônômica de genótipos de batata-doce obtidos de sementes botânica com potencial para produção de etanol**. Tocantins: UFT, 2010.

SILVA, R. N. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 23(3): 337 - 341, set - dez 2003.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.219-231, 2003.

SRICHUWONG, S. *et al.* Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 2012. 39. p.120-127.

STROPARO, E. C. *et al.* Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, nov./dez. 2012.

SURMELY, R. *et al.* **Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v. 3, p. 378-449.

TAVARES, J. T. Q. *et al.* Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, vol. 33, n. 4, 805-809, 2010.

TESTER, R.F. *et al.* Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004.

THU LAN THI NGUYEN, S. H. G.; GARIVAIT, S. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. **Environ. Sci. Technol.** 2007; 41: 4135-42.

TIBAYRENC, P.; BELLOY, L. P.; GHOMMIDH, C.; **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 2011. n. 38, p. 687.

TORTORA, L.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. Artmed: 2005. 8 ed.

VASATHAN, T.; BATTHY, S. Enhancement of resistant starch (RS3) in amylo maize, barley, field pea and lentil starches. **Starch/Stärke**, 1998. v. 50. p. 286-291.

VENTURINI FILHO, W. G.; **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 525.

WHO/FAO. Carbohydrates in Human Nutrition. Rome: FAO, 1998, (**FAO - food and nutrition paper** n. 66).

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. Curitiba: **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2002. v. 45, n.3, p. 393-400.

WOOLFE, J. A. Sweet potato: an untapped food resource. **Cambridge University Press**. 1992.

YANG, H. *et al.* Emergy analysis of cassava based fuel ethanol in China. **Biomass Bioenergy**, 2011; 35 (1): 581-9.

YOUNG, H. Fractionation of Starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.). **Starch chemistry and technology**. 2 ed. Orlando: Academic Press, 1984. p. 249-283.