

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PPGEPro – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
DE PROCESSOS**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA  
MANDIOCA “IN NATURA”, COM O USO DE ENZIMAS  
AMILOLÍTICAS E PECTINOLÍTICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Renata Monteiro Collares**

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2011**

**PPGEP<sup>ro</sup>/UFSM, RS**

**COLLARES, Renata Monteiro**

**Mestre**

**2011**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA  
MANDIOCA “IN NATURA”, COM O USO DE ENZIMAS  
AMILOLÍTICAS E PECTINOLÍTICA.**

**Renata Monteiro Collares**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração de Processos Agroindustriais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lisiane de Marsillac Terra**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Tecnologia  
PPGEP – Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De  
Processos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA MANDIOCA “IN  
NATURA”, COM O USO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E  
PECTINOLÍTICA.**

elaborada por  
**Renata Monteiro Collares**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia de Processos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Lisiane de Marsillac Terra**  
(Presidente/Orientador)

**Marcio Mazutti, Dr. (UFSM)**

**Dilson Antônio Bisognin, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 3 de junho de 2011.

Dedico o presente trabalho

aos meus queridos pais, Oswaldo e Vânia Collares e irmão Yuri, em retribuição a dedicação para comigo, acreditando em meu potencial. Ao meu esposo Dionísio, pela compreensão e apoio nos momentos de dificuldade.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA MANDIOCA “IN NATURA”, COM O USO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS E PECTINOLÍTICA.**

AUTOR: RENATA MONTEIRO COLLARES  
ORIENTADOR: LISIANE DE MARSILLAC TERRA  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 3 de junho de 2011.

A mandioca é uma importante fonte de nutrientes, e também de grande importância como matéria-prima agroindustrial, podendo ser utilizada para a produção de etanol. Através do processo de hidrólise, ácida ou enzimática, o amido é convertido em açúcares. Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais, como dextrinas, maltoses, etc. Este trabalho objetivou a utilização da mandioca “in natura”, de descarte, para a determinação das condições ótimas para a etapa de hidrólise, através da utilização de enzimas amilolíticas e pectinolítica. Foi desenvolvido um Delineamento Composto Central Rotacional,  $2^4$ , com 4 repetições do ponto central e 8 ensaios com os pontos axiais, onde foram utilizados como variáveis independentes dosagem de pectinase (0; 2,35; 4,7; 7,05 e 9,4 $\mu$ L/g de mat.seca), dosagem de amiloglicosidase (0,36; 0,52; 0,68; 0,84 e 1 $\mu$ L/g de amido), diluição da solução mandioca/água (1:1, 1:1,41, 1:2, 1:2,59 e 1:3) e tempo de hidrólise (4, 21, 38, 55 e 72 horas, após adição da última enzima), sendo mantido constante a dosagem de  $\alpha$ -amilase (0,8 $\mu$ L/g amido) para todos os ensaios. As variáveis dependentes analisadas foram °Brix e Eficiência da hidrólise. O Brix está diretamente relacionado com a quantidade de sólidos solúveis, logo o maior valor encontrado foi de 19°Brix, no ensaio que utilizou a diluição mandioca/água 1:1, independente da variação dos demais fatores. A condição ótima de processo foi encontrada com a utilização dos seguintes parâmetros: Dosagem de amiloglicosidase de 0,84 $\mu$ L/g de amido; Dosagem de pectinase de 7,05 $\mu$ L/g de mat.seca; Diluição da solução mandioca/água de 1:1,41 e tempo de hidrólise (após a

adição da última enzima) de 21 horas, com uma eficiência de hidrólise de 100%. A presença da pectinase fez que houvesse um aumento de 20% na eficiência da hidrólise, comparada com ensaios que não a utilizaram.

Palavras chave: amido; sacarificação; pectinase; etanol.

## **ABSTRACT**

Master Thesis  
Graduate Program in Process Engineering  
University Federal of Santa Maria

### **OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF CASSAVA "IN NATURA" HYDROLYSIS, WITH THE USE OF AMYLOLYTIC AND PECTINOLYTIC ENZYMES.**

AUTHOR: RENATA MONTEIRO COLLARES  
ADVISER: LISIANE DE MARSILLAC TERRA

Cassava is an important source of nutrients, and also of great importance as agro-industrial raw materials and can be used to produce ethanol. Through the process of hydrolysis, acid or enzyme, starch is converted into sugars. The hydrolyzed by enzymes are the most important commercial modified starches such as dextrans, maltose, etc. This paper aims at the use of cassava "in natura" disposal, to determine the optimal conditions for hydrolysis step, through the use of pectinolytic and amylolytic enzymes. We developed a Central Composite Rotational Design, 2<sup>4</sup>, with four repetitions of the center point and eight trials with the axial points, which were used as independent variables pectinase dosage (0; 2,35; 4,7; 7,05 and 9,4 µL/g mat.seca) dose of amyloglucosidase (0,36; 0,52; 0,68; 0,84 and 1µL/g starch), diluting the cassava/water (1:1; 1:1,41; 1:2; 1:2,59 and 1:3) and hydrolysis time (4, 21, 38, 55 and 72 hours after the addition of the last enzyme) being kept constant dose of α-amylase (0.8mL/g starch) for all tests. The dependent variables analyzed were °Brix and efficiency of hydrolysis. The Brix is directly related to the amount of soluble solids, and therefore the greatest value found was 19°Brix, who used the test dilution cassava/water 1:1, independent of changes in other factors. The optimum process conditions was found using the following parameters: Dosage of amyloglucosidase of 0,84mL/g starch; pectinase dosage of 7,05mL/g mat.seca; Dilution of cassava solution/water 1:1,41, and hydrolysis time (after the last addition of enzyme) for 21 hours, with an efficiency of 100% hydrolysis. The presence of pectinase did there was a 20% increase in the efficiency of hydrolysis, compared with trials that have not used it.



Key words: starch; hydrolysis; saccharification; pectinase; ethanol.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.....	22
FIGURA 2 -	Estrutura da amilose.....	23
FIGURA 3 -	Representação esquemática da amilose, arranjo espacial	24
FIGURA 4 -	Estrutura química da amilopectina.....	25
FIGURA 5 -	Representação esquemática da amilopectina, arranjo espacial.....	26
FIGURA 6 -	Fluxograma do processo de hidrólise/sacarificação da mandioca pela ação de enzimas amilolíticas.....	44
FIGURA 7 -	Fotos do reator utilizado para o processo de hidrólise	45
FIGURA 8 -	Foto do banho metabólico.....	45
FIGURA 9 -	Diagrama de Pareto para a resposta Brix.....	53
FIGURA 10 -	Diagrama de Pareto para a resposta Eficiência da hidrólise.....	53
FIGURA 11 -	Valores observados em função dos valores preditos para a resposta Brix.....	56
FIGURA 12 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para °Brix em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e a diluição.....	57
FIGURA 13 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para °Brix em função da diluição e a pectinase (µL/g de mat. seca).....	58
FIGURA 14 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para °Brix em função da diluição e a tempo (horas após a adição da última enzima).....	58
FIGURA 15 -	Comportamento do Brix durante o processo de hidrólise do amido em função do tempo.....	59
FIGURA 16 -	Valores observados em função dos valores preditos para a resposta Eficiência da Hidrólise.....	60
FIGURA 17 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b)	62

	para a Eficiência da hidrólise em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e diluição.....	
FIGURA 18 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e o tempo (horas após a adição da última enzima).....	63
FIGURA 19 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e pectinase ( $\mu\text{L/g}$ de mat. seca).....	63
FIGURA 20 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da diluição e o tempo (horas após a adição da última enzima).....	64
FIGURA 21 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da pectinase ( $\mu\text{L/g}$ de mat. seca) e o tempo (horas após a adição da última enzima).....	65
FIGURA 22 -	Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da diluição e a pectinase ( $\mu\text{L/g}$ de mat. seca).....	65
FIGURA 23 -	Perfis dos valores preditos e desejabilidade.....	66
FIGURA 24-	Comportamento da Eficiência durante processo de hidrólise do amido.....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Propriedades do amido de mandioca em comparação com alguns outros amidos.....	16
TABELA 2 -	Composição química por 100 g de raiz de mandioca.....	17
TABELA 3 -	Comparação entre as propriedades de amilose e amilopectina.....	27
TABELA 4 -	Faixa de temperatura de gelatinização de alguns amidos.	28
TABELA 5 -	Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido.....	34
TABELA 6 -	Enzimas utilizadas e especificações de utilização.....	41
TABELA 7 -	Valores utilizados em cada nível do planejamento.....	43
TABELA 8 -	Valores dos tempos pré-determinados para a retirada das amostras.....	46
TABELA 9 -	Composição da mandioca “in natura”.....	49
TABELA 10-	Resultados do planejamento experimental.....	51
TABELA 11-	ANOVA para a resposta Brix.....	52
TABELA 12-	ANOVA para a resposta Eficiência da hidrólise.....	52
TABELA 13-	Amido inicial, Amido hidrolisado observado, Predito.....	69
TABELA 14-	Etanol teórico em relação ao $AR_{gerado}$ e Amido Hidrolisado.....	71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	Objetivos gerais e específicos.....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Mandioca</b> .....	15
2.1.1	Aspectos gerais da planta.....	15
2.1.2	Utilização da mandioca no Brasil.....	18
2.1.3	Mandioca como matéria-prima para a produção de hidrolisados.....	20
<b>2.2</b>	<b>Amido</b> .....	21
2.2.1	Amilose.....	23
2.2.2	Amilopectina.....	24
2.2.3	Fenômeno da Gelatinização.....	27
<b>2.3</b>	<b>Fibras</b> .....	29
<b>2.4</b>	<b>Enzimas</b> .....	29
2.4.1	Propriedades das enzimas.....	31
2.4.2	Enzimas amilolíticas.....	32
2.4.3	Enzimas pectinolíticas.....	34
<b>2.5</b>	<b>Hidrólise do amido</b> .....	36
<b>2.6</b>	<b>Delimitação Composto Central Rotacional (DCCR)</b> .....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1</b>	<b>Matéria prima</b> .....	42
3.1.1	Análise Centesimal e teor de Amido.....	42
<b>3.2</b>	<b>Planejamento experimental - Estratégia experimental por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)</b> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Procedimento experimental</b> .....	43
<b>3.4</b>	<b>Tratamento das Amostras</b> .....	46
<b>3.5</b>	<b>Análises do hidrolisado de mandioca</b> .....	47
3.5.1	Determinação da Concentração de Açúcares Redutores pelo Método do Ácido Dinitrossalicílico (ADNS).....	47
3.5.2	Determinação do pH.....	47
3.5.3	Determinação de °Brix.....	47
<b>3.6</b>	<b>Determinação do amido hidrolisado</b> .....	47
<b>3.7</b>	<b>Determinação do teor de etanol teórico</b> .....	48
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	49
<b>4.1</b>	<b>Caracterização da matéria – prima</b> .....	49
<b>4.2</b>	<b>Resultados experimentais do planejamento estatístico</b> .....	50
<b>4.3</b>	<b>Discussão das análises do hidrolisado de mandioca</b> .....	54
4.3.1	Açúcares Redutores.....	54
4.3.2	pH.....	55
4.3.3	Discussão para Brix.....	55
4.3.4	Discussão para a resposta Eficiência da hidrólise.....	60
4.3.5	Discussão para a resposta Amido hidrolisado.....	68
4.3.6	Determinação do teor de etanol teórico.....	70
4.3.7	Ação da Pectinase.....	72
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	75

# 1 INTRODUÇÃO

A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos: fácil propagação, elevada tolerância a estiagens, rendimentos satisfatórios, potencial de resistências ou tolerância a pragas e doenças, além de elevado teor de amido nas raízes, sem grandes perdas de massa seca (CEREDA e VILPOUX, 2003).

Os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácidos, calor e pressão), ou via enzimática. Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. Incluem desde dextrinas até os açúcares derivados de amido, passando pelas ciclodextrinas. Esses hidrolisados são amplamente utilizados em setores alimentícios (CEREDA e VILPOUX, 2003).

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos no sentido de se obter combustíveis menos poluentes, a partir de matérias-primas renováveis. Entre as alternativas apresentadas atualmente está o uso do hidrogênio e do biodiesel. No entanto, essas tecnologias encontram-se em fase de desenvolvimento. Outra alternativa, talvez a mais viável até o momento, é o uso do etanol, que tem sua tecnologia bastante desenvolvida, sendo o Brasil maior detentor da tecnologia de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Além da sacarose da cana-de-açúcar, outra fonte de carboidratos utilizada em alguns países como Estados Unidos e França na produção de etanol é o amido (SILVA et. al., 2006; SILVA et. al., 2008; LEONEL, 1998).

O amido é considerado uma das fontes mais abundantes de carboidratos na natureza. No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, de uso consagrado na produção industrial de etanol, não é capaz de converter o amido diretamente a etanol, sendo necessárias usualmente duas etapas prévias para a conversão do amido em açúcares fermentescíveis: liquefação ou dextrinização com a enzima  $\alpha$ -amilase e sacarificação com a amiloglicosidase (SILVA et. al., 2006; SILVA et. al., 2008).

Nestes experimentos foram utilizadas as enzimas  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase e pectinase. A concentração da  $\alpha$ -amilase foi fixada em 0,8 $\mu$ L/g de amido, para todo o estudo, pois segundo Apar et. al. (2004) a variação da concentração de  $\alpha$ -amilase

não influencia significativamente no processo de hidrólise para obtenção de açúcares fermentescíveis, e a concentração da amiloglicosidase e pectinase, que age na quebra da fibra da raiz da mandioca e assim liberando o amido aprisionado nas fibras (PINELO et. al., 2010), variaram conforme o estabelecido no planejamento de experimentos, seguindo parâmetros recomendados pelo fornecedor e encontrados na revisão bibliográfica. A utilização de uma metodologia de planejamento fatorial juntamente com a análise de superfície de resposta e uma ferramenta que fornece informações seguras e assim sendo possível otimizar um processo (RODRIGUES e IEMMA., 2005).

A otimização processo de hidrólise do amido pode contribuir para o desenvolvimento do conceito de produção de combustíveis por meio de energia renováveis e hidrolisados para indústria alimentícia.

### **1.1 Objetivos gerais e específicos**

Este trabalho teve como objetivo geral a investigação do melhor aproveitamento de um processo de hidrólise enzimática para a produção de etanol, em escala laboratorial, de amido proveniente de mandioca imprópria para a venda *in natura*. Além de contribuir para o desenvolvimento do conceito de produção de combustíveis por meio de energia renováveis.

Objetivos específicos:

- Utilização de mandioca “in natura”, de descarte para a obtenção de açúcares fermentescíveis por via enzimática.
- Obtenção de modelos empíricos para Concentração de açúcar redutor, Brix e Eficiência da Hidrólise, utilizando como variáveis independentes a concentração das enzimas amiloglicosidase e pectinase, Relação sólido/líquido da solução mandioca/água e tempo de hidrólise, estatisticamente significativos.
- Estimar a quantidade de etanol combustível gerado a partir da hidrólise enzimática da mandioca.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mandioca

#### 2.1.1 Aspectos gerais da planta

A mandioca (*Manihot esculenta*) pertence à família *Euphorbiaceae*, uma das maiores dentro das dicotiledôneas. Nesta família, são encontrados 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e África. Apresenta-se como um arbusto de 2 a 3 metros de altura, de raiz tuberosa, com alto valor como alimento quando cozida, dependendo da variedade, mas de alto valor tóxico quando crua. As raízes são utilizadas na alimentação humana, na forma de farinha, fécula ou polvilho, tapioca, ou, ainda, frita ou cozida (DALLAQUA e CORAL, 2002).

A mandioca é uma raiz com alto teor de amido cultivada na América Tropical a mais de 5000 anos. Antes de 1600 os negociantes portugueses levaram a mandioca até o continente africano e depois até a África oriental e Ásia. A mandioca é originária do Brasil, região amazônica fronteira com a Venezuela e se constitui em alimento energético para mais de 400 milhões de pessoas no mundo, sobretudo em países subdesenvolvidos, onde é cultivada por pequenos agricultores, em áreas reduzidas e com baixa produtividade (CEREDA e VILPOUX, 2003).

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor mundial de mandioca com produção inferior somente a da Nigéria. Segundo dados da Food and Agriculture Organization – FAO (2009), em 2008 a produção brasileira totalizou 26,5 milhões de toneladas, aproximadamente 11,9% do total produzido no mundo. A mandioca é uma importante fonte de nutrientes para a população mundial, porém, também se constitui como importante matéria prima agroindustrial, podendo também ser utilizada para a produção de etanol (RIZATO et. al., 2009).

A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos: fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, rendimentos satisfatórios



mesmo em solos de baixa fertilidade, pouco exigente em insumos modernos, potencial resistência a pragas e doenças. Apresenta elevado teor de amido nas raízes e boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, sem grandes perdas na matéria seca. Além disso, permite consórcio com inúmeras plantas alimentícias e industriais (MARCON et. al., 2007).

O amido da mandioca é de alta expansão, pois os seus grânulos sofrem grande inchamento quando aquecidos em água, porém as forças associativas internas tornam-se grágeis com a agitação mecânica, fazendo com que o viscoamilograma de Brabender apresente pico de viscosidade seguido de acentuada queda durante o cozimento (MARCON et. al., 2007).

As características dos grânulos refletem as propriedades dos amidos. A pasta de amido de tubérculos e raízes apresenta géis mais fracos e pouco consistentes, porém são de alta viscosidade, translúcidos, longos, coesivos, fibrosos (FRANCO et. al., 2001; FREITAS et. al., 2003) e de baixa tendência para retrogradar pelo seu baixo conteúdo de amilose (RAKSHIT, 2004).

A Tabela 1 apresenta as propriedades do amido de mandioca em comparação com alguns outros amidos. A Tabela 2 apresenta a composição química por 100g de raiz de mandioca.

Tabela 1 – Propriedades do amido de mandioca em comparação com alguns outros amidos.

Amido	Viscosidade de pasta	Textura de pasta	Clareza de pasta	Grau de retrogradação
Mandioca	Alta	Longa	Muito clara	Baixo
Milho	Média – Baixa	Curta	Opaca	Alta
Trigo	Baixa	Curta	Turva	Alto
Batata	Muito alta	Longa	Clara	Baixo

Fonte: RAKSHIT (2004) MARCON et. al., 2007 ).

Alguns dados comparativos expressam as diferenças entre os amidos de cereais, tubérculos e raízes. Por exemplo, o amido de mandioca é menos resistente à degradação enzimática, apresenta temperatura mais baixa de gelatinização ,

poder de inchamento do grão a 70°C de 30g/g, enquanto para o de amido de milho é de 10 g/g, com índice de solubilização também maior (FRANCO et. al., 2001).

O amido de mandioca é de alta expansão, pois os seus grânulos sofrem grande inchamento quando aquecidos em água, porém as forças associativas internas tornam-se frágeis com a agitação mecânica, apresentam um pico de viscosidade seguido de acentuada queda durante o cozimento (MARCON et. al., 2007).

Tabela 2 - Composição química por 100 g de raiz de mandioca.

COMPOSIÇÃO	PESO ÚMIDO	PESO SECO
Calorias	135,00	335,00
Umidade (g)	65,50	15,70
Proteínas (g)	1,00	1,40
Lipídios (g)	0,20	0,50
Amido (g)	32,40	80,60
Fibra (g)	1,10	1,20
Cinzas (mg)	0,90	1,80
Cálcio (mg)	26,00	96,00
Fósforo (mg)	32,00	81,00
Ferro (mg)	0,90	7,90
Sódio (mg)	2,00	-
Potássio (mg)	394,00	-
Vitamina B2(mg)	0,04	0,06
Vitamina C (mg)	34,00	0,00
Niacina (mg)	0,60	0,80
Glicosídeos cianogênicos (%)	-	1,60

Fonte: PANDEY et al. (2000 apud MARCON et. al. 2007).

A consistência das pastas de maido de mandioca aumenta muito pouco como resfriamento, o que indica um baixo potencial de formação de gel, ao contrário do que ocorre com cereais e leguminosas (RICKARD et. al., 1991).

Tendo em vista a pesquisa de Franco et. al. (2001), pode-se afirmar que as moléculas mais longas de amilose do amido de mandioca apresentam menor tendência à retrogradação e uma força de ligação mais elevada se comparadas às amiloses de baixo grau de polimerização como são as do milho e as do trigo.

Sriroth et al. (1999 apud MARCON et. al. 2007) e Chatakanonda et al. (2003) mostraram que alguns fatores influem para a qualidade do amido de mandioca. A quantidade de chuva antes da colheita influencia a temperatura da pasta, a qual aumenta na estação seca e diminui na estação chuvosa. Também a idade da colheita influencia, pois as raízes de mandioca estão maduras após 12 meses e, geralmente, são colhidas com 14 a 16 meses. Essa demora resulta no aumento do conteúdo de amido, diminuição do conteúdo de água e aumento do teor de fibras, o que dificulta a extração do amido. Nos amidos de grânulos mais velhos, há diminuição do teor de amilose na distribuição do tamanho do grânulo.

### 2.1.2 Utilização da mandioca no Brasil.

O cultivo da mandioca está associado ao Brasil desde o seu descobrimento. Planta-se mandioca em todas as unidades da federação, e o produto tem destacada importância na alimentação humana e animal, além de ser utilizado como matéria-prima de inúmeros produtos industriais.

Segundo o IBGE (2010), uma área colhida em 2011 de 1,9 milhão de hectares, que é 5,1% maior que a área colhida em 2010. A produção nacional de mandioca para 2011 é estimada em 27,1 milhões de toneladas, variação positiva de 9,2% em relação à safra de 2010, não havendo diferenciação entre o destino da produção de raízes, na coleta de dados, sendo ela para a indústria ou para o consumo doméstico (mandioca de mesa).

Tradicionalmente, as variedades de mandioca apresentam duas denominações: de mesa, para o consumo humano e industrial, para o processamento em farinha, fécula ou mesmo alimentação animal. A mandioca de uso culinário recebe diferentes denominações nas diversas regiões do Brasil, tais como aipim, macaxeira ou mandioca de mesa. Além disso, uma grande variedade de produtos pode ser obtida a partir da mandioca, como a farinha de mesa, fécula ou

polvilho doce, beiju, carimã ou massa puba, tucupi, tacacá e também a folha de mandioca é consumida em um prato tipicamente da Amazônia chamado maniçoba (MATTOS et. al., 2002).

Atualmente, novos produtos têm sido desenvolvidos com o objetivo de agregar valor a esta cultura como a mandioca minimamente processada, embalada a vácuo, pré-cozida congelada, fritas, chips e snacks (CEREDA e VILPOUX, 2003).

A produção anual de fécula de mandioca no ano de 2006 foi de 574,8 mil toneladas, volume 5,1% maior que o de 2005. Apesar disso, em 2006 o valor médio da produção de fécula no Brasil ficou 7% menor que o observado em 2005 (R\$ 401,6 milhões), totalizando R\$ 373,5 milhões. Em 2006, o principal setor comprador foi o de papel e papelão, adquirindo mais de 26% da produção total. O segundo principal setor comprador foi o de frigoríficos (19,5%), seguido por atacadistas (16,8%), massas, biscoitos e panificação (14,5%), indústrias químicas (6,6%), setor têxtil (4,9%) e varejista (4,8%). A compra de fécula por outras fecularias (transação dentro do setor) representou 3,1%. Em 2006, os preços chegaram a ser inferiores aos custos de produção, diminuindo a rentabilidade do produtor e reduzindo o interesse pelo plantio de novas áreas (CEPEA/ESALQ, 2006 apud SANTANA, 2007).

Pela alta pureza e baixo custo, o amido de mandioca é muito utilizado pela indústria para a produção de farinha e fécula (CHATAKANONDA et. al., 2003).

As empresas especializadas na produção de amido de mandioca estão distribuídas principalmente nos estados de Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e São Paulo. Suas escalas variam de pequeno a médio porte até agroindústrias (CEREDA, 2001).

A Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca (ABAM) elaborou a árvore do amido, incluindo o amido de mandioca, com a finalidade de ilustrar o potencial tecnológico dessa importante matéria-prima (MARCON et. al., 2007).

### 2.1.3 Mandioca como matéria-prima para a produção de hidrolisados

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de mandioca, com transformação industrial da raiz em farinha e fécula. Nos países Europeus e nos Estados Unidos, mais de 50% da produção de amido é destinada à produção de hidrolisados tais como glicose, maltose, dextrinas e maltodextrinas. No Brasil, a Corn Products e a Cargill, duas multinacionais americanas, são as maiores produtoras de hidrolisados e, como as demais empresas mundiais do setor, utilizam apenas amido de milho como matéria-prima. A Tailândia, Índia e China produzem xaropes de glicose a partir de fécula de mandioca em escala industrial, demonstrando a viabilidade do processo com esta matéria-prima (CEREDA e VILPOUX, 2003).

Uma vantagem competitiva no caso da mandioca é de que os hidrolisados podem ser elaborados através de um processo mais simples e com menor investimento, devido a características particulares das féculas, tais como menor temperatura de gelificação e menores teores de proteínas e lipídeos. A obtenção de xaropes por via enzimática requer o controle de uma ou mais reações enzimáticas e a integração industrial da etapa enzimática com o restante do processo. Como são disponíveis no comércio muitas enzimas comerciais, a seleção de enzimas específicas, a escolha do substrato e as determinações das condições operacionais são primordiais (CEREDA e VILPOUX, 2003).

O processo enzimático permite a fabricação de uma ampla gama de hidrolisados com a mesma linha de equipamentos, enquanto que por via ácida é possível apenas a produção de glicose e dextrina. Entretanto, a produção de cada tipo de hidrolisado requer ajustes de parâmetros e condições experimentais específicas (CEREDA e VILPOUX, 2003).

A mandioca já foi utilizada como matéria prima para a produção de álcool etílico em períodos de grande dificuldade energética. Há relatos bibliográficos de que essa matéria-prima foi usada no período de 1932 a 1945, que corresponde ao colapso da economia mundial da década de 30 e a segunda guerra mundial e na década de 70, com o advento do Proálcool. Observou-se que, uma vez cessadas as dificuldades do momento, abandonava-se a mandioca como matéria prima para a produção de álcool, prevalendo a utilização da cana-de-açúcar (VENTURINI FILHO E MENDES, 2003).

Segundo Venturini Filho e Mendes (2003), a produtividade de etanol para a mandioca é de 4,88 m<sup>3</sup>/ha.ano. Isto daria uma produção de 376 litros de álcool por tonelada de mandioca, enquanto a cana-de-açúcar produz entre 90 e 100 litros por tonelada. Vários produtos da mandioca, como a fécula, farinha, raspas, bem como a própria raiz podem ser usados na produção de álcool, com rendimentos de 607,47; 515,2; 508,83; e 240,59 litros por toneladas, respectivamente.

## 2.2 Amido

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. O material puro pode ser obtido por processos simples a partir de partes de plantas como sementes, caules e raízes (SANTANA, 2007).

O amido, polissacarídeo que consiste de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose apenas e como tal, pode ser considerado uma homoglucana (ou homopolissacarídeo). Entretanto, estruturas hierarquicamente complexas devem ser consideradas no grânulo de amido (SANTANA, 2007).

A fórmula geral do amido é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . As unidades de glicose estão ligadas entre si pelos carbonos C1–C4 e C1–C6, através de oxigênio, formando ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$ (1-6) (SURMELY et. al., 2003).

A Figura 1 mostra o esquema das ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amido.

O amido, que se apresenta na forma de discretos grânulos com forma e tamanho dependente da sua fonte botânica, é composto basicamente por dois tipos de macromoléculas: amilose e amilopectina. O amido deve muito de sua funcionalidade a estas duas macromoléculas, assim como à organização física das mesmas dentro da estrutura granular (BILIARDERIS, 1991).

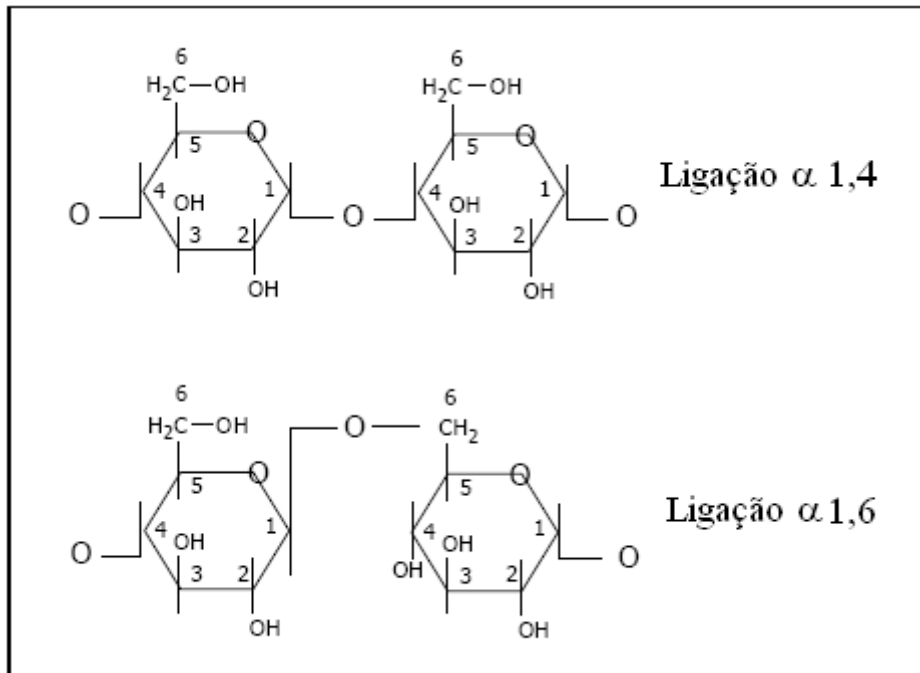


Figura 1 – Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.

Além destes dois polímeros principais, alguns estudos têm mostrado a existência de um terceiro componente denominado material intermediário (TAPARELLI, 2005).

A quantidade e estrutura deste material diferem de acordo com o tipo e grau de maturação do grânulo de amido. Segundo Biliarderis (1991) o material intermediário consiste de cadeias lineares com grau de polimerização (DP) variando de 50 a 200 e moléculas levemente ramificadas de baixo peso molecular ( $<10^6$ ) e com comprimento de cadeia maior que o comprimento da amillose normal.

A diversidade de características possíveis entre grânulos de amido, inclusive nos mesmos cultivares de uma mesma matéria prima amilácea, justificam o extremo rigor no delineamento estatístico, com vista à divulgação de resultados confiáveis.

Recursos analíticos avançados vêm colaborando para a caracterização de amidos, tais como a ressonância magnética nuclear (RMN), a calorimetria diferencial de varredura (DSC), raios X e infravermelho (MARCON et. al., 2007).

### 2.2.1 Amilose

A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha$  (1-4) com um pequeno número de ramificações. Seu grau de polimerização (GP ou DP em inglês) é controverso e parece ser dependente do vegetal de origem e do estágio de crescimento (TAPARELLI, 2005).

A mandioca possui teores de amilose próximos a 17% (MARCON et. al., 2007)

Buléon et. al. (1998) destacaram que existem nos grânulos de amido moléculas de amilose estritamente lineares e outras que apresentam ramificações. Os autores comentam que estudos têm demonstrado um comportamento similar entre amiloses quando em solução. Independentemente de serem lineares ou não, têm a mesma reação com iodo, diferenciando-se da amilopectina.

A Figura 2 mostra a estrutura linear da amilose do amido, já a Figura 3 mostra o arranjo espacial da amilose.

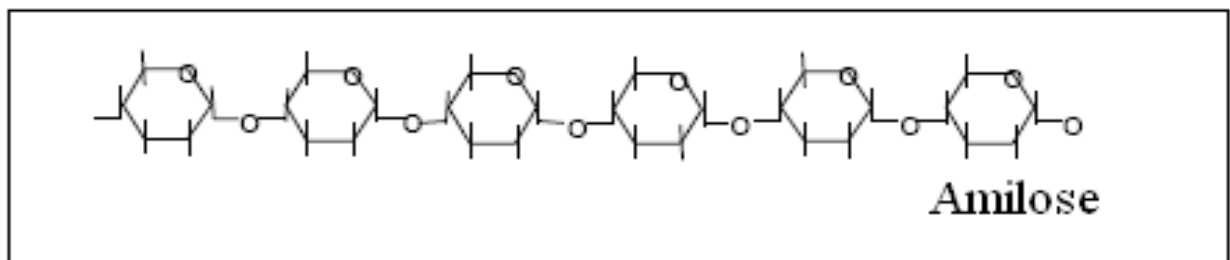


Figura 2 – Estrutura da amilose.

O peso molecular desse polímero é variável com a fonte e as condições de processamento empregadas na extração do amido, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose. Em uma das extremidades da cadeia polimérica a unidade terminal de glicose apresenta uma hidroxila primária e duas secundárias, assim como um grupamento aldeído redutor da molécula. A extremidade oposta ou final não-redutor apresenta uma unidade de glicose contendo uma hidroxila primária a três secundárias, sendo que as outras unidades de glicose do polímero apresentam uma hidroxila primária e duas secundárias (TAPARELLI, 2005).





Figura 3. Representação esquemática da amilose, arranjo espacial (TAPARELLI, 2005)

A amilose é determinada por diversas metodologias, porém nenhuma é totalmente aceita como ideal. Há variações nos dados da literatura o que comprova a falta de uma técnica completamente confiável para sua quantificação.

### 2.2.2 Amilopectina

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada formada por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha(1-4)$  e com 5 a 6% de ligações  $\alpha(1-6)$  nos pontos de ramificação. A grande maioria dos amidos contém 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina e essa razão varia com a fonte botânica (TAPARELLI, 2005). É composta por centenas de cadeias curtas de (1-4)- $\alpha$ -D-glucanas que são interligadas pelas ligações (1-6).

O amido da mandioca possui teores de 17% de amilose e 83% de amilopectina (MARCON et. al., 2007).

A Figura 4 mostra a estrutura química da amilopectina e a Figura 5 mostra a representação esquemática da amilopectina, arranjo espacial.

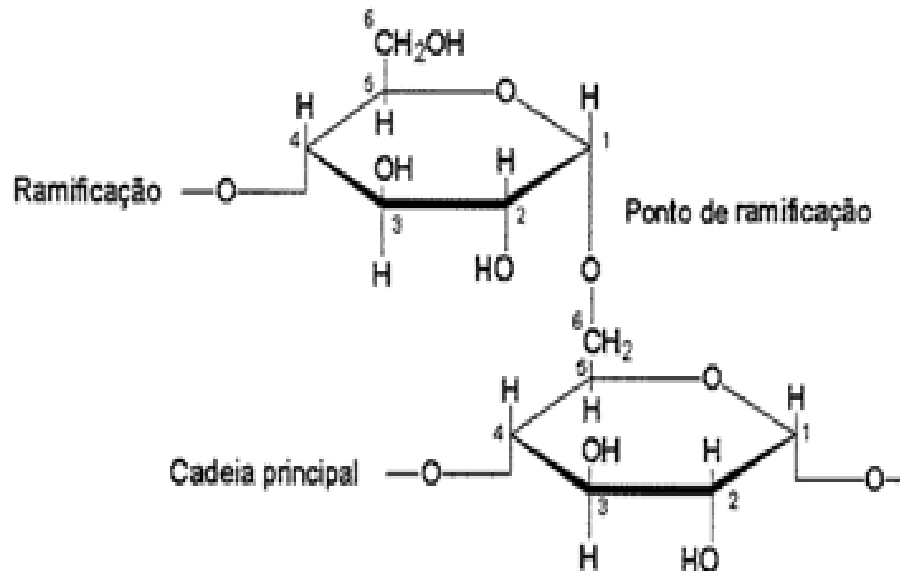


Figura 4 – Estrutura química da amilopectina.

A amilopectina apresenta um grau de polimerização de cerca de  $10^4 - 10^5$ , peso molecular da ordem de  $950-500 \times 10^6$  e o comprimento das ramificações é variável mas é comum apresentarem entre 20 e 30 unidades de glicose. Em presença de iodo a amilopectina dá coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas (BILIARDERIS, 1991).

A estrutura fina da amilopectina tem sido assunto de pesquisas durante os últimos anos. Vários modelos estruturais têm sido propostos para explicar o modo das cadeias unitárias arranjam-se para proporcionar estrutura altamente ramificada (TAPARELLI, 2005).

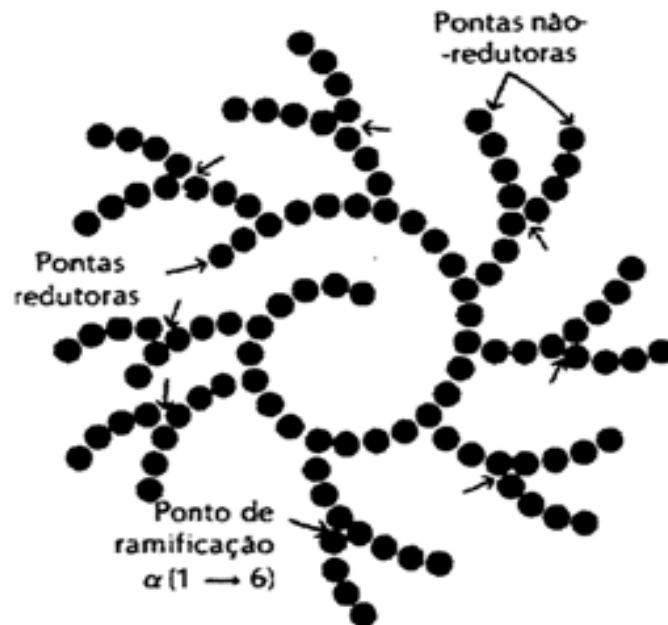


Figura 5 – Representação esquemática da amilopectina, arranjo espacial (TAPARELLI, 2005).

O grânulo de amido é birrefringente e, sob luz polarizada, apresenta uma típica cruz de malta, que pode ser cêntrica ou excêntrica. No entanto, birrefringência e geometria cristalina não estão necessariamente relacionadas. Assim, a birrefringência implica apenas que existe um alto grau de organização molecular no grânulo, sem que isso se refira a qualquer forma cristalina (TAPARELLI, 2005).

A Tabela 3 mostra a comparação entre as propriedades de amilose e amilopectina.

A maior viscosidade da amilose, em relação à amilopectina, é devido à forma de bastão da mesma, em comparação com a forma “globular” da amilopectina, o que interfere na reologia do sistema (TAPARELLI, 2005).

De maneira clássica, essas moléculas podem ser caracterizadas pelo grau de polimerização (DP), ramificadas ou não, o que afeta a capacidade de ligação com iodo e a susceptibilidade a enzimas assim como a viscosidade intrínseca (TAPARELLI, 2005).

Tabela 3 – Comparação entre as propriedades de amilose e amilopectina.

	Amilose	Amilopectina
Estrutura geral	Essencialmente Linear	Ramificado
Reação com Iodo	Azul Intenso	Vermelho violeta
Afinidade por Iodo	19 – 20%	1%
Peso molecular	$10^5 - 10^6$	$10^7 - 10^8$
Extensão da Cadeia (números médio de unidade de glicose por grupos redutores)	2.000 ou mais	19 – 20
Extensão da Cadeia Externa (número de glicose médio)	-	12 – 17
Extensão da Cadeia Interna (número de glicose médio)	-	5 – 8
Análise de Raio X	Cristalino	Amorfo
Solubilidade em água	Variável	Solúvel
Estabilidade em solução aquosa	Retrograda	Estável
Viscosidade intrínseca	1,8 – 2,2	1,8 – 2,0

Fonte: CIACCO E CRUZ, 1982; WHISTLER et. al., 1984 apud TAPARELLI, 2005)

### 2.2.3 Fenômeno da Gelatinização

O compostamento térmico dos amidos envolve gelatinização, solubilização, transição vítrea, cristalização, mudança de estrutura cristalina, expansão de volume, degradação molecular e movimento de água (MARCON et. al., 2007).

O aquecimento de uma suspensão aquosa de amido provoca a quebra de pontes de hidrogênio, que mantém o arranjo molecular dentro do grânulo. Os grupos hidroxilas das unidades de glicose, que participavam das áreas cristalinas, são hidratados provocando o inchamento do grânulo (TAPARELLI, 2005).

A viscosidade da pasta está relacionada com as características estruturais dos amidos e, por tanto, a fatores como fonte de origem, teor de amilose, tamanho e comprimento de cadeias ramificadas de amilopectinas, teores de mono éster fosfato, fosfolipídios e lipídios, proteínas, fibras, estruturas cristalinas, tamanho de grânulos, arquitetura granular, presença de cátions metálicos, incorporação de emulsificantes e, também, adição de ácidos, bases e ação de enzimas (GUNARATINE e HOOVER, 2002).

A Tabela 4 descreve a faixa de temperatura de gelatinização de alguns amidos. Devido às características individuais, nem todos os grânulos começam a inchar na mesma faixa de temperatura. Este processo geralmente ocorre em uma faixa de temperatura de 10°C (TAPARELLI, 2005).

Tabela 4 - Faixa de temperatura de gelatinização de alguns amidos.

Origem do Amido	Faixa de Temperatura de Gelatinização (°C)
Batata (tubérculo)	56 – 66
Mandioca (raiz)	58 – 70
Milho (cereal)	62 – 72
Trigo (cereal)	52 – 63
Arroz (cereal)	61 – 77

Fonte: CIACCO E CRUZ (1982 apud TAPARELLI, 2005).

Fécula de batata, que é facilmente gelatinizada com uma temperatura de gelatinização a baixo de 60°C, sendo menos suscetível à hidrólise com glicoamilase que o amido de tapioca que é prontamente gelatinizado a uma temperatura de gelatinização de 60°C, sendo bem mais suscetíveis a hidrólise com glicoamilase do que foi fécula de batata (KIMURA et. al., 1995).

Amido de milho, que é muito mais difícil de gelatinizar com temperatura de gelatinização de 70°C, havia sobre o mesmo grau de susceptibilidade à hidrólise glicoamilase assim como amido de tapioca, que é relativamente fácil de gelatinizar (KIMURA et. al., 1995).

## 2.3 Fibras

As fibras são constituintes normais da parede das células vegetais. São polissacarídeos comumente referidos como substâncias não digeridas pelo organismo e neste grupo estão as celuloses, hemiceluloses, lignina, pectina, substâncias algáceas, gomas e mucilagens (LEONEL, 1998).

Dependendo da solubilidade de seus constituintes em água, as fibras podem ser agrupadas em solúveis e insolúveis. São consideradas fibras solúveis: pectina, gomas e certas hemiceluloses e, pertencendo ao grupo das fibras insolúveis: celulose, lignina e outras hemiceluloses (LEONEL, 1998). A hemicelulose é um polímero de glicose, xilose, galactose, manose, arabinose, etc. As unidades de monossacarídeos se encontram em ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ - 1,4 e  $\alpha$ - 1,6. As substâncias pécticas são heteropolissacarídeos ramificados com alto peso molecular de 30.000 a 300.000, que consistem de uma cadeia principal de ácido D-galacturônico com ligação glicosídica  $\alpha$ - 1,4, intercalados por resíduos de L-raminose com ligação  $\alpha$ - 1,2 parcialmente esterificados com metanol. (LEONEL, 1998)

Os polissacarídeos pécticos são designados como pectina, ácido péctico e protopectina. O termo protopectina tem sido empregado para substâncias pécticas insolúveis em água, que sob hidrólise produzem ácidos pécticos. O ácido péctico (ou ácido poligaracturônico) é um polímero de alto peso molecular constituído de unidades de ácido galacturônico e resulta da remoção dos grupos metílicos da molécula de pectina (FARAGO & MAHMOUD, 1983 apud LEONEL, 1998). Na presença de água as pectinas dão soluções altamente viscosas mesmo em baixas concentrações, e junto com a sacarose e ácido em proporções adequadas formam geis muito estáveis (BOBBIO & BOBBIO, 1989 apud LEONEL, 1998).

## 2.4 Enzimas

As enzimas são macromoléculas da categoria das proteínas globulares. Algumas são holoproteínas, constituídas somente de uma cadeia de aminoácidos

enquanto outras são heteroproteínas, contendo uma parte não protéica. Essa parte não protéica é o co-fator, que pode ser inorgânico como um metal ou orgânico como uma coenzima. As enzimas apresentam dupla especificidade (LEHNINGER, 1985 apud CEREDA e VILPOUX, 2003):

- Especificidade reacional: uma enzima só pode catalisar um tipo de reação, como, por exemplo, a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas do amido.
- Especificidade do substrato: algumas enzimas têm especificidade restrita a um substrato e não podem atacar moléculas diferentes, mesmo com estrutura semelhante. Entretanto, outras possuem especificidade mais ampla e atuam sobre vários substratos.

Segundo Cuvelier (1993 apud CEREDA e VILPOUX, 2003), a origem das enzimas pode ser:

- Vegetal: as enzimas desta origem usadas pela bio-indústria podem ser proteases, como papaína do mamão, a bromelina do abacaxi e a ficina do figo. Um complexo amololítico muito usado na indústria cervejeira é o malte de cereais.
- Animal: somente uma categoria de enzimas apresenta atualmente interesse industrial, são as pepsinas bovinas e do porco.
- Microbiana: o processo fermentativo é a fonte quase que exclusiva de obtenção de enzimas comerciais. As vantagens desta fonte são numerosas, como uma independência geográfica e de estação, a utilização de um substrato barato, rendimentos de produção aumentados por seleção de cepas microbianas e uma produção de enzimas com propriedades e especificidades diversas.

### 2.4.1 Propriedades das enzimas

Mouranche (1985 apud CEREDA e VILPOUX, 2003) citou algumas condições para que as enzimas possam ser empregadas com o máximo de desempenho:

- Especificidade: para cada fase da reação, há necessidade de apenas um tipo de enzima;
- Otimização do pH: todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração hidrogênica ( $H^+$ ) do meio. Existe um pH para qual a atividade enzimática é máxima, que pode ser básico ou ácido em função da enzima. O pH ótimo de uma enzima não é obrigatoriamente igual ao pH do seu meio natural;
- Otimização da temperatura: como o pH, as enzimas têm uma temperatura ou faixa de temperatura na qual sua atividade é máxima. Em geral, é preferível usar enzimas que suportam alta temperatura para permitir aumento da cinética da reação e proteger o meio contra eventuais contaminações microbianas;
- Unidade da atividade enzimática: a unidade internacional de atividade enzimática, o katal (kat), foi definido como a quantidade de enzima que transforma um Mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões. Para uma unidade menor usa-se a quantidade de enzima que transforma um  $\mu$ Mol de substrato por minuto. Apesar desta normatização internacional, cada fabricante de enzima define as próprias unidades em condições experimentais particulares.



### 2.4.2 Enzimas amilolíticas

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e, mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações do amido (Mercier, 1985 apud CEREDA e VILPOUX, 2003). Elas podem ser classificadas pelo mecanismo de ação ou pela ação em si (ROBYT, 1984 e FORGARTY, 1983 apud CEREDA e VILPOUX, 2003).

Classificação das enzimas amilolíticas de acordo com o mecanismo de ação:

- Endo enzimas:  $\alpha$ -amilase, CGTase e pululanase, que cortam ao acaso as ligações glicídicas no interior da molécula;
- Exo enzimas:  $\beta$ -amilase, amiloglicosidase, que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora.

Classificação das enzimas amilolíticas de acordo com a ação:

$\alpha$ -amilase: O alfa-amilase pode hidrolisar o amido em glicose maltose, maltotriose e pela clivagem das ligações 1,4- $\alpha$ -D-glicosídicas entre unidades de glicose adjacentes na cadeia de amilose linear. Esta enzima pode ser obtido a partir de vários fungos, leveduras, bactérias e Actinomyces. No entanto, fontes fúngicas e bacterianas têm as principais aplicações na indústria de alimentos. Microorganismos *Alkalophilic*, em espécies de *Bacillus licheniformis particular*, como *Bacillus*, têm atraído muito interesse nas últimas décadas devido à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que são estáveis a pH elevado (DELGADO et. al., 2009).

O fato da  $\alpha$ -amilase quebrar as ligações 1,4- $\alpha$ -D-glicosídicas, torna a pasta gelatinizada menos consistente e fornece maior número de terminais de cadeias para a ação das enzimas sacarificantes. Esta enzima não rompe as ligações  $\alpha(1-6)$ , portanto, todos os pontos de ramificação ficaram intactos após o tratamento com a  $\alpha$ -amilase. Por esta razão, esta enzima é comumente denominada de enzima liquidificante (SANTANA, 2007).

Segundo Menezes (1982 apud CEREDA e VILPOUX, 2003), outra enzima atua no amido a  $\alpha$ -glicosidase, que ataca as ligações  $\alpha$  (1-4), das moléculas de maltose e, em menor grau, as dextrinas, formando glicose.

- Glucoamilase ou amilo-1,6-glicosidase: é uma enzima liquidificante e sacarificante, que hidrolisa completamente o amido em glicose a partir de uma extremidade não redutora. É a única capaz de hidrolisar ao mesmo tempo as ligações  $\alpha$ (1-4) e  $\alpha$ (1-6). O resultado da conversão enzimática do amido por glucoamilase é a transformação total em unidades de glicose. Glucoamilases são produzidos por um grupo diversificado de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e moulds, no entanto as enzimas usadas comercialmente são produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* (DELGADO et. al., 2009).

Algumas espécies de fungos produzem enzimas amilolíticas em grande quantidade e são utilizados pela indústria. Entre os mais comuns estão as espécies *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e alguns gêneros *Mucor*, *Amolimyces* e *Rhizopus*. Podem ser utilizadas também algumas espécies de bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* e *Clostridium sp.* (FRANCO et. al., 2001).

As enzimas amilolíticas foram capazes de hidrolisar amido granular em uma temperatura de gelatinização-sub (35°C) com um valor alto de Dextrose Equivalente. O grau de hidrólise de amido foi melhorada pelo pré-tratamento do amido com o calor suave abaixo de sua temperatura de gelatinização, antes de ser submetidas à hidrólise enzimática. Em um estado granular, amido encontrado na tapioca pode ser mais suscetíveis ao ataque de enzimas comparado com fécula de batata doce com ou sem tratamento térmico (SHARIFFA, et. al., 2009).

A Tabela 5 caracteriza os diferentes tipos de amilases sobre o amido.

Tabela 5 – Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido.

Características	$\alpha$ -amilase	Glucoamilase
Especificidade	Ligação $\alpha$ – 1,4	Ligação $\alpha$ – 1,4 e $\alpha$ -1,6
Mecanismo	Endoamilase	Exoamilase
Principal produto da hidrólise	Dextrinas	Glicose
Diminuição da consistência	Rápida	Lenta
Perda da cor do iodo	Lento	Lenta
Aumento do poder redutor	Lenta	Rápido
Produção de glicose	Lenta	Rápida
Produção de maltose	Lenta	Não
Produção de dextrinas	Rápida	Lenta

Fonte: TAPARELLI, 2005.

#### 2.4.3. Enzimas pectinolíticas

As enzimas pécticas são classificadas em dois grupos principais, as pectinesterases e as polimerases.

As pectinesterases são classificadas como hidrolases de ésteres carboxílicos e convertem a pectina em ácido péctico e metanol por hidrólise dos ésteres metílicos. As despolimerases são classificadas conforme o tipo de substrato (pectina, ácido péctico ou oligo D- galacturonatus) e o padrão de clivagem das ligações glicosídicas, que podem ser do tipo endo ou exo. A ação das liases sobre a pectina ou pectato origina ácido galacturônico insaturado ou seus oligômeros (LEONEL, 1998).

O uso de enzimas complementares no processo de hidrólise do farelo de mandioca advém como uma alternativa para aumentar o rendimento do processo. Vem sendo estudado o uso de pectinases como auxiliares na liquefação da pasta, ou seja, diminuição da viscosidade favorecendo a ação das amilases. (LEONEL e CEREDA, 1998)

O ataque da pectinase pode resultar em dois eventos diferentes. A enzima catalisa a degradação de moléculas pécticas em frações menores, as quais em suspensão contribuem para um aumento de turbidez imediato. Ou então, a enzima pode atuar encapsulando partículas protéicas de pectina em suspensão, resultando em uma aglomeração que pode levar ao aumento da turbidez transitória. (PINELO et. al., 2010)

A ação combinatória das enzimas pectinase e celulase são frequentemente encontradas como tema de pesquisas visto que apresentam a mesma função. Çinar (2004) em estudo sobre os efeitos das concentrações destas enzimas sobre o rendimento da extração de pigmentos carotenóides observa que estas rompem a parede celular da casca de laranja, batata doce e cenoura e libera os carotenóides nos cloroplastos e em fluidos celulares.

A mandioca contém uma proporção significativa de grânulos de amido e de fibras. O alto conteúdo de fibras dificulta a extração do amido, mantendo os grânulos juntos e presos em uma rede fibrosa, que pode ser rompida por métodos enzimáticos. Uma mistura de pectinases e celulases quebram a integridade estrutural da matriz responsável pelo aprisionamento dos grânulos, expondo e liberando o amido. (UNEJO E PASTORE, 2007)

Segundo estudos de Leonel e Cereda (1998) o uso da pectinase como enzima complementar no processo de hidrólise do amido proporciona um aumento no rendimento demonstrando uma eficiência 30% superior que a obtida nos tratamentos sem esta enzima. A celulase como enzima complementar não mostrou efeito significativo no rendimento da hidrólise.

## 2.5 Hidrólise do amido

No processo de hidrólise ou sacarificação de matérias-primas amiláceas ocorre a transformação do amido em açúcar, o que pode se dar através de processo contínuo ou descontínuo, com hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta a vantagem de ser mais rápida, porém tem como desvantagens evidentes os problemas de corrosão de equipamentos e necessidade de neutralização (SURMELY et. al., 2003).

Na hidrólise enzimática, enzimas de origem vegetal ou microbiana podem ser usadas. Destaca-se o malte, o farelo enzimático (cultivo de microrganismos amilolíticos, como o fungo da espécie *Aspergillus oryzae*, cujo crescimento se dá em farelo de milho, trigo, arroz ou cevada, previamente gelatinizados) e enzimas comerciais obtidas de microrganismos (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

A hidrólise enzimática em relação às demais é da maior relevância, porque é capaz de desenvolver nas condições brandas de temperatura e de concentração iônica existentes e necessárias aos processos celulares. Para que possa haver o aproveitamento do amido como fonte energética, dado o seu teor em glicose, usam-se microrganismos que: a) ou são capazes de hidrolisar o amido que é disponível, porque o “aparelho” enzimático é capaz de hidrolisar o polissacarídeo; b) ou são capazes de fermentar, isto é, transformar em outros produtos, o amido hidrolisado disponível. São muitos os microrganismos capazes da primeira ou da segunda alternativa; mas são muito menos difundidos os capazes tanto de hidrolisar, como de fermentar.

Vários trabalhos encontrados durante a revisão bibliográfica trataram de diferentes variáveis de forma isolada, ou com poucas variações como pode ser observado em Leonel e Cereda (1998) que estudaram o farelo de mandioca, um subproduto da extração da fécula, como matéria prima para a obtenção de álcool, utilizando pectinase como enzima complementar às enzimas amilolíticas, concluindo que 86,31% do amido e 70,46% da matéria seca inicial foram hidrolisados neste processo, constatando, também, redução de 23,04% do conteúdo de fibras presentes no farelo inicial. Estes mesmos autores em outro estudo (LEONEL e CEREDA, 2000) obtiverem cerca de 90% de hidrólise do amido inicial contido no farelo de mandioca, utilizando enzimas comerciais.

O estudo de Ferreira et. al. (2006), mostrou os efeitos da temperatura e concentração de amido, mantendo fixa a quantidade de enzima e utilizando amilases de malte de milho, concluindo que o processo de hidrólise do amido de mandioca pelas amilases do malte de milho durou entre 20 a 30 horas e seu melhor rendimento foi alcançado a 65 °C para quaisquer concentrações de amido empregado neste trabalho, na qual conseguiu atingir valores de rendimento acima dos 30%. O trabalho apresentou condições ótimas para produzir um xarope fermentável a partir do amido de mandioca, como alternativa a substituição da cana-de-açúcar, e a sua viabilidade de emprego na produção de álcool.

No trabalho de Rodrigues et. al. (2009), onde foi utilizado radiação de microondas para o pré- tratamento álcali da fibra de caju seguido de hidrólise enzimática de material lignocelulósico mostrando o aumento da concentração de glicose, variando o tempo de hidrólise de 0 a 72 horas. Os autores concluíram que o tempo de pré tratamento e potência do microondas não influenciaram de forma significativa na hidrólise enzimática para a formação de glicose.

Em seu estudo Cunha et. al. (2009), variaram as concentrações de bagaço, temperatura e tempo de reação, onde avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de mandioca por glucoamilase obtida por fermentação em estado sólido, as concentrações de bagaço utilizadas foram de 5, 10, 15 e 20% m/m, temperatura da hidrólise variando de 20 a 80°C e o tempo de reação nos valores 10, 30, 60 e 80 minutos, tendo os melhores resultados de hidrólise foram nas soluções contendo 15% m/m de bagaço de mandioca à 60°C por 80 minutos.

A utilização da alfa-amilase com dosagem variada foi amplamente estudada por Apar et. al. (2004), que mostraram que a variação da quantidade de  $\alpha$ -amilase não interfere significamente no processo de hidrólise do amido, o que serviu de base para a utilização da alfa-amilase de forma fixa no presente trabalho.

A partir dos trabalhos avaliados, observou-se uma grande variedade nas condições empregadas no processo de hidrólise, onde foi possível observar que a seleção de enzimas específicas, a escolha do substrato e as determinações das condições operacionais são primordiais para maiores rendimentos.

Para a obtenção de hidrolisado e uma posterior fermentação para a obtenção de etanol é possível encontrar diversas patentes que tratam deste assunto, dentre elas encontram-se as seguintes patentes:

- Patente nº 4,376,163, United States Patent

Processo para a produção de etanol por fermentação contínua de matérias-primas contendo polissacarídeo.

Esta invenção se refere a um processo para a produção de etanol por fermentação contínua matérias-primas contendo polissacarídeo. A fermentação é realizada em um ou varios fermentadores, e uma corrente de licor de fermentação é separado em um fluxo concentrado de levedura e um fluxo de levedura-livre, e um fluxo corrente para concentrar a levedura é recirculada para o fermentador, pelo menos parte do fluxo de levedura-livre está sendo alimentada a uma unidade de evaporador simples, correspondendo a uma ou algumas etapas de destilação, onde é separado, em parte, em um fluxo de vapor em primeiro lugar, enriquecido em etanol, que é alimentado a uma planta para a produção do desejado grau de etanol, e em parte em um fluxo líquido, que é pelo menos em parte recirculada no fermentador. Caracterizando principalmente para o novo processo é que um fluxo de matéria-prima é alimentado a um circuito de circulação, compreendendo um fermentador em que o fluxo de matéria-prima é hidrolisada e uma unidade de evaporador. É especialmente vantajosa para a realização desta hidrólise por enzimas, de preferência por gluco-amilase a uma temperatura dentro da faixa de 35° a 75°C.

- Patente nº 7,579,177, United States Patent.

Processo de produção de etanol.

A presente invenção refere-se a processos para a produção de um produto de etanol a partir de amido granular compreendendo um pré-tratamento a uma temperatura elevada de amido granular seguido de sacarificação e fermentação simultâneos.

-Patente nº 4,490,469, United States Patent.

Produção de etanol por fermentação.

Esta invenção refere-se a produção de etanol especialmente para uso como combustível, por fermentação de um material contendo açúcar ou de um material contendo amido, ou de um material contendo ambas as substâncias. Em particular, se refere à produção de etanol combustível em alto rendimento por um processo que é econômico em uma escala muito menor do que é o caso com a tecnologia existente e que requer apenas o uso de equipamentos simples e relativamente barato.

## 2.6 Delineamento Composto Central Rotacional

Delineamento de Experimentos (DOE) é o plano formal para a condução do experimento, ou seja, são testes conduzidos de forma planejada, onde os fatores (ou variáveis controladas) são alterados de modo a avaliar-se seu impacto sobre uma variável resposta. Quando se necessita desenvolver ou melhorar um processo, o pesquisador precisa planejar um experimento para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes têm sobre as respostas. (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A forte competitividade, a difusão da tecnologia, bem como a competência e a responsabilidade dos pesquisadores atuais inviabiliza o desenvolvimento de produtos e processos através de procedimentos de tentativa e erro. Neste contexto, devido à necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem despertado a busca de técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Vaz, 2009).

O número de planejamentos experimentais fatoriais necessários depende principalmente do número de variáveis independentes a serem estudadas inicialmente. No caso de duas ou três variáveis independentes ou fatores, não devemos realizar um fatorial fracionado, sendo mais recomendado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) ou Planejamento Fatorial com Pontos Axiais ou ainda Planejamento Estrela (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), do inglês “Response Surface Methodology” (RMS), é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. A MSR é essencialmente um conjunto de técnicas estatísticas, compostas por planejamento e análise de experimentos, que procura relacionar respostas com os níveis de fatores quantitativos e suas interações (CUSTÓDIO, 2000).

A metodologia de superfícies de resposta tem duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem



necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O planejamento experimental reduz o número de experiências ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados, o que significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final. O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificarem, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (BARROS NETO et. al., 2007).

Quando se têm mais de uma variável de resposta e se tem interesse em encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes, o programa estatístico utiliza a abordagem da função Desirability (desejabilidade). Com este artifício, a otimização simultânea das variáveis de respostas maximiza-se num único valor, a desejabilidade global. A vantagem do uso dessa definição é que a desejabilidade global sempre é anulada quando uma resposta apresenta um valor inaceitável, mesmo que outras respostas apresentem valores aceitáveis (BARROS NETO et. al., 2007).

Ferreira et. al. (2006), estudaram os efeitos da temperatura e concentração de amido, por um delineamento experimental  $2^2$ , sendo as variáveis independentes temperatura e concentração do amido, mantendo fixa a quantidade de enzima e utilizando amilases de malte de milho, concluindo que o processo de hidrólise do amido de mandioca pelas amilases do malte de milho durou entre 20 a 30 horas e seu melhor rendimento foi alcançado a 65 °C para quaisquer concentrações de amido empregado neste trabalho, na qual conseguiu atingir valores de rendimento acima dos 30%. O trabalho apresentou condições ótimas para produzir um xarope fermentável a partir do amido de mandioca, como alternativa a substituição da cana-de-açúcar, e a sua viabilidade de emprego na produção de álcool.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nas dependências do laboratório da Pós Graduação em Engenharia de Processos, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 3.1 Matéria prima

A mandioca foi adquirida em comércio local, sendo mandiocas rejeitadas para venda *in natura* pelo tamanho, cortes e defeitos, plantada em setembro de 2009, colhida dia 26/07/2010. A variedade da mandioca estudada é do tipo branca de mesa, informações essas cedidas pelo fornecedor da matéria-prima.

A matéria prima foi armazenada em um congelador vertical (Modelo: FE26; Marca: Electrolux) sob temperatura de aproximadamente  $-18^{\circ}\text{C}$ , sendo transferida, um dia antes da realização do experimento, para uma geladeira (Modelo: RDE35; Marca: Electrolux) com temperatura média entre  $5 - 8^{\circ}\text{C}$ . Os valores ótimos de pH, temperatura de utilização e temperatura de desativação das enzimas utilizadas nos experimentos, fornecido pelos fabricantes e bibliografias podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Enzimas utilizadas e especificações de utilização.

Enzima	Nome comercial	Fabricante	pH	Temperatura utilização	Temperatura desativação
$\alpha$ -amilase	Star Max TG120	Prozyn	5,5 – 5,8	95 – 100°C	>115°C
Amiloglicosidase	Star Max GA400	Prozyn	3,5 – 5,0	58 – 65°C	>80°C
Pectinase	Pectinase	Sigma Aldrich	4,5 – 5,5	45 – 55°C	>60°C

Fonte: Prozyn, 2010.

### 3.1.1 Análise Centesimal e teor de Amido

As análises centesimais compreendem análise de Umidade, Cinzas, Fibra Bruta, Proteína Bruta, Extrato Etéreo, Extrativos Não Nitrogenados e Açúcares de acordo com as técnicas estabelecidas pela AOAC (1994).

O teor de amido foi determinado por hidrólise ácida, seguido da análise de açúcares redutores pelo método de Lane & Eynon (IAL, 1985), e multiplicado pelo fator de conversão 0,9 (LEONEL e CEREDA, 1998).

As análises da matéria prima foram realizadas pelo Laboratório de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, pertencente ao departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade federal de Santa Maria.

### 3.2 Planejamento experimental - Estratégia experimental por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após uma análise profunda do processo, e uma vasta revisão bibliográfica (item 2.5), foi possível determinar as variáveis independentes a serem estudadas, as faixas de estudos de cada uma delas e as respostas de interesse. A Tabela 8 mostra os valores utilizados em cada nível do planejamento.

A dosagem de alfa-amilase foi fixada na maior dosagem recomendada pelo fabricante, 0,8 $\mu$ L/g de amido, com base no estudo realizado por Apar et. al., (2004).

Neste trabalho realizou-se um DCCR 2<sup>4</sup>, com 4 repetições do ponto central e 8 ensaio com os pontos axiais, totalizando 28 ensaios.

- Variáveis independentes:
  - Amiloglicosidase, mg/g de amido em base seca;
  - Pectinase,  $\mu$ L/g de massa seca de mandioca;
  - Tempo de hidrólise, em horas a contar apartir da adição da última enzima;
  - Diluição da solução mandioca/água (m/m)

- Variáveis dependentes:
- Eficiência da hidrólise; - °Brix.

Tabela 7 – Valores utilizados em cada nível do planejamento.

Variáveis↓	Níveis→				
	-2	-1	0	+1	+2
Amiloglicosidase (mg/g de amido)	0,36	0,52	0,68	0,84	1
Pectinase (μL/g matéria seca)	0	2,35	4,7	7,05	9,4
Tempo (h a contar a partir da adição da amiloglicosidase)	4	21	38	55	72
Diluição(m/m)	1:1	1:1,41	1:2	1:2,59	1:3

### 3.3 Procedimento experimental.

A matéria-prima foi recebida e logo em seguida lavada, pesada nas porções a serem utilizadas, congeladas e mantidas em um freezer à aproximadamente -18°C.

A Figura 6 apresenta o processo de hidrólise/sacarificação da mandioca pela ação das enzimas amilolíticas, sendo descrito logo em seguida.

No dia anterior ao experimento a porção a ser utilizada era retirada do freezer e colocada na geladeira e conservada a temperatura entre 5 - 8°C.

A porção de mandioca descongelada foi retirada da geladeira e cortada em pedaços de aproximadamente 2 cm de espessura. Em seguida, a mandioca foi triturada aos poucos num liquidificador doméstico, até redução de tamanho, com adição de metade da água do experimento, batido por aproximadamente 10 minutos após a adição da última fração de mandioca.

Essa pasta foi colocada em um reator de aço inox (Metalquim, Figura 7) com capacidade de 5L, sendo adicionado o restante da água, até completar o volume de 2L. Posteriormente o reator foi ligado a uma temperatura de 45°C sob agitação de 200 rpm, sendo feita o ajuste de pH para 5,5, com Ácido Clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>. Foi coletado 20 mL de amostra e, em seguida, adicionou-se as enzimas alfa-amilase e pectinase (quantidades estabelecidas no planejamento experimental). Após a

estabilização da temperatura em 45°C, a amostra foi mantida por uma hora e, logo após, elevou-se a temperatura à 95°C, mantendo-se a essa temperatura por uma hora sob agitação de 200 rpm. Ao fim desse tempo a amostra da massa foi resfriada para 60°C e, após a estabilização a essa temperatura, o pH foi ajustado para 4,3 com HCl 1 molL<sup>-1</sup>.

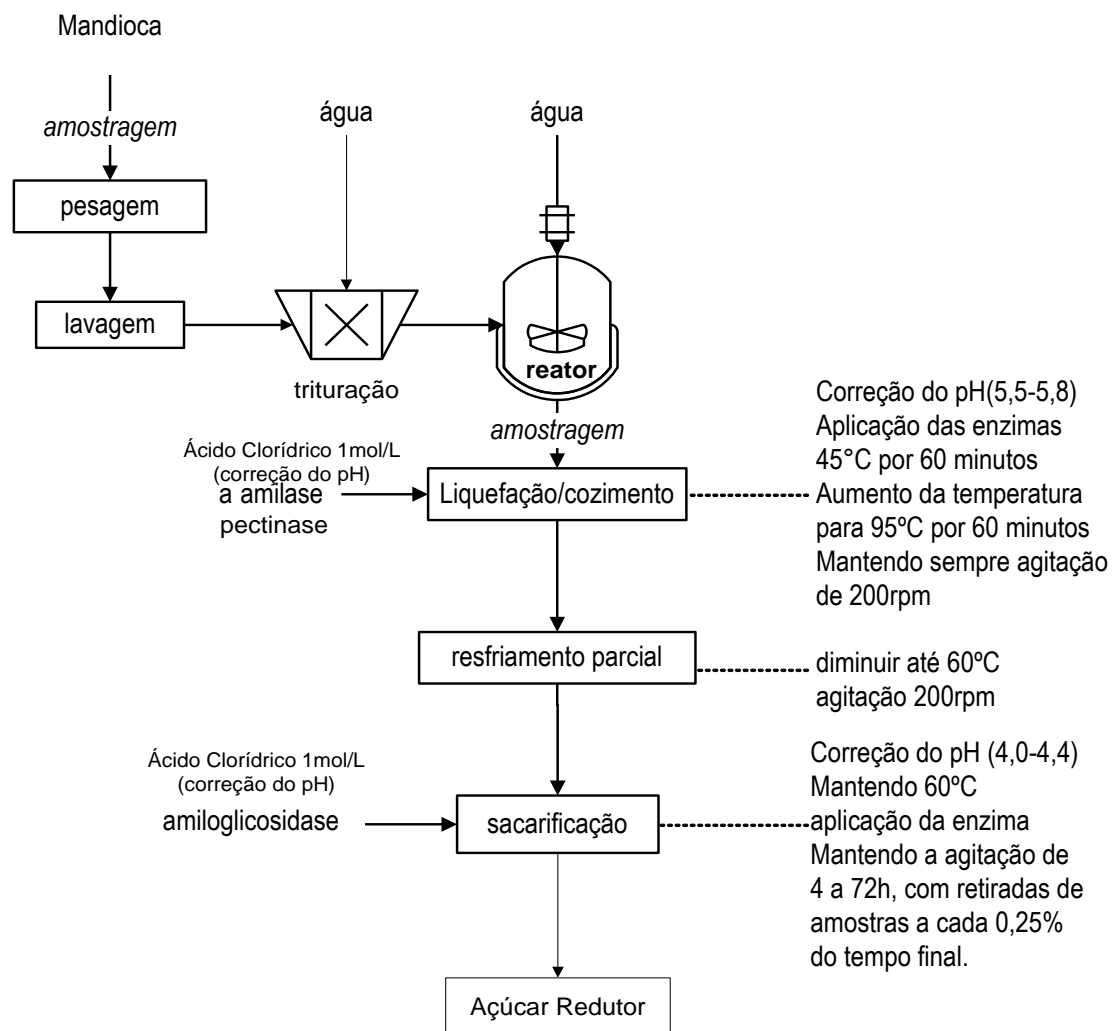


Figura 6 – Fluxograma do processo de hidrólise/sacarificação da mandioca pela ação de enzimas amilolíticas.

Em seguida adicionou-se a enzima amiloglicosidase, esperou-se a homogeneização da massa (aproximadamente 5 minutos), retirou-se uma alíquota (30mL) para análise pH, Brix, e posterior análise de açúcar redutor), e transferiu-se toda a massa do reator para um frasco de vidro com capacidade para 2,5L, alocado

em um banho metabólico (tipo Dubnoff MA 093, Marconi, Figura 8) com agitação em 5 -6, à 60°C. O tempo decorrido neste banho foi determinado pelo planejamento experimental, variando de 4 a 72h, sendo retiradas amostras (30mL) em 4 intervalos de tempo proporcionais ao tempo total de hidrólise após a adição da última enzima (amiloglicosidase), como está representados na Tabela 8.



Figura 7 - Reator utilizado para o processo de hidrólise.



Figura 8 – Banho metabólico

Tabela 8 – Valores dos tempos pré-determinados para a retirada das amostras.

Ensaio	Tempo de hidrólise após a adição da última enzima	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo
		1	2	3	4	5
21	4 h	0h	1h	2h	3h	4h
1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 e 12	21h	0h	5,25h	10,5h	15,75h	21h
17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27 e 28	38h	0h	9,5h	19h	28,5h	38h
5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 e 16	55h	0h	13,75h	27,5h	41,25h	55h
22	72h	0h	18h	36h	54h	72h

### 3.4 Tratamento das Amostras

No decorrer dos experimentos foram retiradas alíquotas de amostra, aproximadamente 30mL, submetidas posteriormente a processo de hidrólise de cada tempo pré determinado de cada ensaio, onde foram realizadas análises como a leitura de °Brix, pH, e coloração com solução de Lugol, para a determinação visual da hidrólise do amido e a diluição de 1:100, para que a concentração de glicose das amostras estejam dentro da faixa de concentração da curva de calibração.

As amostras foram congeladas, durante 6 semanas, após esse tempo foram feitas as diluições das mesmas. De cada amostra diluída foram retiradas alíquotas de 10mL, que foram transferidas para tubos de centrífuga graduados e centrifugadas na velocidade 2000 rpm por 10 min (Centrífuga marca Centribio, Modelo 802B). Recolheu-se o sobrenadante em um tubo identificado para as determinações de açúcares redutores totais (ART), descrito a seguir.

### **3.5 Análises do hidrolisado de mandioca**

#### **3.5.1 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores pelo Método do Ácido Dinitrossalicílico (ADNS)**

O método de análise de ART empregado foi o método ADNS (SILVA et. al., 2003), O método foi modificado para leitura da absorbância e não transmitância, em função do software do espectrofotômetro (Modelo: UVT6; Marca: Spectro Vision), a 540 nm.

#### **3.5.2 Determinação do pH**

Para a determinação do pH foi empregado a análise potenciométrica do mosto. O principal objetivo foi observar as possíveis alterações do pH durante a hidrólise e sacarificação dos produtos. As amostras foram submetidas a pHmetro com eletrodo de vidro, por 3 minutos.

#### **3.5.3 Determinação de °Brix**

Para a determinação do °Brix foi utilizado um refratômetro digital (Modelo Palm – 1, Marca: ATAGO). As medidas foram feitas a temperatura de 20 °C.

### **3.6 Determinação do amido hidrolisado.**

O conteúdo de amido foi estimado pela quantificação dos açúcares redutores, pelo método ADNS (seção 3.5.1). Os resultados foram expressos em termos de



glicose, sendo empregada a conversão para amido multiplicando-se pelo fator 0,9, segundo descrito em Leonel e Cereda (1998).

### 3.7 Determinação do teor de etanol teórico

O rendimento teórico de etanol é dado pela equação 1 e a quantidade de etanol teórico foi estimado através da equação 2, onde leva-se em consideração a relação estequiométrica, onde 1mol de ART gera 2mol de etanol (SANTANA, 2005 e ALMEIDA, 2006).

$$Y_{p/s} \text{ Teórico (g/g)} = \frac{92}{180} = 0,51 \quad (1)$$

Onde 180 é a massa de 1mol de glicose e 92 é a massa de 2mol de etanol.

$$Q_{\text{TEO}} = \text{Concentração de etanol teórico} = \text{Quantidade de açúcares consumidos} \times 0,511; \quad (2)$$

Onde 0,511 é o rendimento teórico da conversão de  $AR_{\text{gerado}}$  em etanol.

## 4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.

### 4.1 Caracterização da matéria - prima

Os resultados obtidos na caracterização da mandioca *in natura* estão descritos na Tabela 9.

A mandioca *in natura* apresentou um teor de amido de 77,94%, muito próximos aos citados por Cereda que apresentou um teor de amido de 73,78% (1996 apud Leonel, 1998), assim como o teor de amido de 80% encontrado por Leonel (1998) e o valor encontrado em Pandey et al. (2000 apud Marcon et. al., 2007) que foi de 80,60%.

O teor de fibra encontrado de 1,15 g% (base úmida) está bem próximo do valor encontrado por Pandey et al. (2000 apud Marcon et. al., 2007) de 1,10 g% (base úmida), assim como o valor do teor de proteína 1,12 g% e cinzas 0,69 g% comparados com os valores encontrados em Pandey et al. (2000 apud Marcon et. al., 2007) que foi de proteína 1,00 g% e cinzas 0,90 g%.

Tabela 9 – Composição da mandioca “in natura”.

Composição	Base úmida (g%)	Base seca (g%)
Umidade	62,44	-
Matéria seca	37,56	100
Extratos não nitrogenados	34,34	91,43
Extrato Etéreo	0,27	0,72
Fibra bruta	1,15	3,06
Cinzas	0,68	1,81
Proteína Bruta	1,12	2,98
Açúcares	3,24	8,63
Amido	29, 275	77,94

## 4.2 Resultados experimentais do planejamento estatístico

Para o estudo do processo hidrolítico de produção de açúcares redutores, foi montado um planejamento a fim de avaliar as variáveis do processo e suas influências no rendimento de açúcares redutores. A hidrólise enzimática foi realizada conforme descrito na seção 3.3.

Os resultados se mostraram dentro do esperado, mostra a Tabela 10, onde com o estudo posterior da ANOVA é possível quantificar a influência dos fatores estudados, ou a falta dela. Pode-se também, observar a influência da enzima pectinase, que age na fibra da mandioca liberando o amido aprisionado para o ataque das enzimas amilolíticas.

A  $\alpha$ -amilase age sobre as ligações  $\alpha$ -1,4 do amido, basicamente na amilose hidrolisando o amido em dextrina, já a amiloglicosidase age tanto nas ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 presentes na amilopectina, devido a sua grande quantidade de ramificações.

O amido é formado de monômeros glicosídicos, logo a ação das enzimas amilolíticas é diretamente nessas ligações.

Os parâmetros da ANOVA para o modelo foram utilizados na análise estatística (Tabelas 9 e 10). A verificação do ajuste do modelo foi feita pela determinação do  $r^2$  (coeficiente de determinação do modelo) calculado. Pode-se dizer que o modelo (regressão) obtido explicou, 97%, 99% e 87%, para açúcar redutor, Brix e eficiência da hidrólise, da variação total em torno da média foram explicada pela regressão.

A significância estatística das variáveis foi calculada com o teste F (Fischer), comparando-se com o  $F_{\text{calculado}}$  que é a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, com a distribuição do F teórico (Dist F), o que mostra que a regressão, neste caso, tem significância estatística, sendo  $F_{\text{calc}} > \text{Dist F}$ , logo os resultados obtidos estão fora da área de aceitação da hipótese nula, sendo assim são significativos, confirmando assim a relação entre as variáveis para o planejamento.

Tabela 10 – Resultados experimentais.

Ensaio	Amilogli cosidase	Pectinase	Tempo	Diluição	Açúcar Redutor (g.L <sup>-1</sup> )	Amido Hidrolisado (g.L <sup>-1</sup> )	Brix	Eficiência da hidrólise (%)
1	-1	-1	-1	-1	114,6	103,17	15,2	85
2	1	-1	-1	-1	127,7	114,98	15,1	94,73
3	-1	1	-1	-1	118,2	106,98	15,7	87,65
4	1	1	-1	-1	140,6	126,56	15,3	100
5	-1	-1	1	-1	107,3	96,59	15,1	79,58
6	1	-1	1	-1	115,0	103,54	15,4	85,31
7	-1	1	1	-1	108,3	97,53	15,9	80,36
8	1	1	1	-1	131,1	118,05	15,4	97,26
9	-1	-1	-1	1	46,82	42,14	9,9	51,74
10	1	-1	-1	1	69,51	62,56	10,3	76,81
11	-1	1	-1	1	68,82	61,94	10,2	76,05
12	1	1	-1	1	78,69	70,82	10,6	86,95
13	-1	-1	1	1	59,12	53,22	10,2	65,35
14	1	-1	1	1	83,44	75,1	10,7	92,2
15	-1	1	1	1	64,77	58,29	10,9	71,57
16	1	1	1	1	81,05	72,95	10,7	89,56
17	-2	0	0	0	72,27	65,05	12,5	66,69
18	2	0	0	0	81,45	73,3	12,5	75,15
19	0	-2	0	0	68,12	61,31	12,4	62,85
20	0	2	0	0	92,97	83,68	11,7	85,07
21	0	0	-2	0	94,36	84,92	12,4	87,07
22	0	0	2	0	87,43	78,69	12	80,68
23	0	0	0	-2	166,7	150,04	19	100
24	0	0	0	2	61,81	55,63	9,4	76,08
25	0	0	0	0	87,51	78,76	12,3	80,75
26	0	0	0	0	89,85	80,86	12,8	82,91
27	0	0	0	0	85,31	76,78	12,4	78,72
28	0	0	0	0	86,88	78,19	12,4	80,16

As equações de regressão resultante do planejamento para cada resposta, estão representadas nas equações 3 e 4. Sendo as variáveis codificadas A = amiloglicosidase, P = Pectinase, D = Diluição e T = tempo de hidrólise após a adição da última enzima.

$$^{\circ}Brix = 12,74 - 2,45D + 0,46(D^2) \quad (3)$$

$$Efic. Hidrolise = 80,64 + 6,11(A) + 4,53(P) - 6,54(D) + 2,7(D^2) + 3,51(TxD) \quad (4)$$

Tabela 11 – ANOVA para a resposta Brix.

Fator	SQ	nGL	MQ	F	p
Regressão	151,09	14	10,79	F <sub>calc</sub> = 99,9	<0,0001
Resíduo	1,41	13	0,108		
Total	152,5	27			

$r^2=0,99$ , Dist F = 2,53

Tabela 12 – ANOVA para a resposta Eficiência da hidrólise.

Fator	SQ	nGL	MQ	F	p
Regressão	3196,14	14	228,29	F <sub>calc</sub> =6,38	0,0009
Resíduo	466,11	13	35,7681		
Total	3662,25	27			

$r^2 = 0,87$ , Dist F = 2,53

As Figuras 9, 10 mostram os diagramas de Pareto, exibindo os efeitos variáveis e, também, demonstrando o brix é dependente somente da diluição da solução, o que é previsto pelo brix ser uma leitura de sólidos solúveis, que Eficiência da hidrólise depende das variáveis da Diluição, dosagem de amiloglicosidase e pectinase, além da relação tempo pela Diluição, pelo modelo linear e também da variável Diluição pelo modelo quadrático, com 95% de confiança.

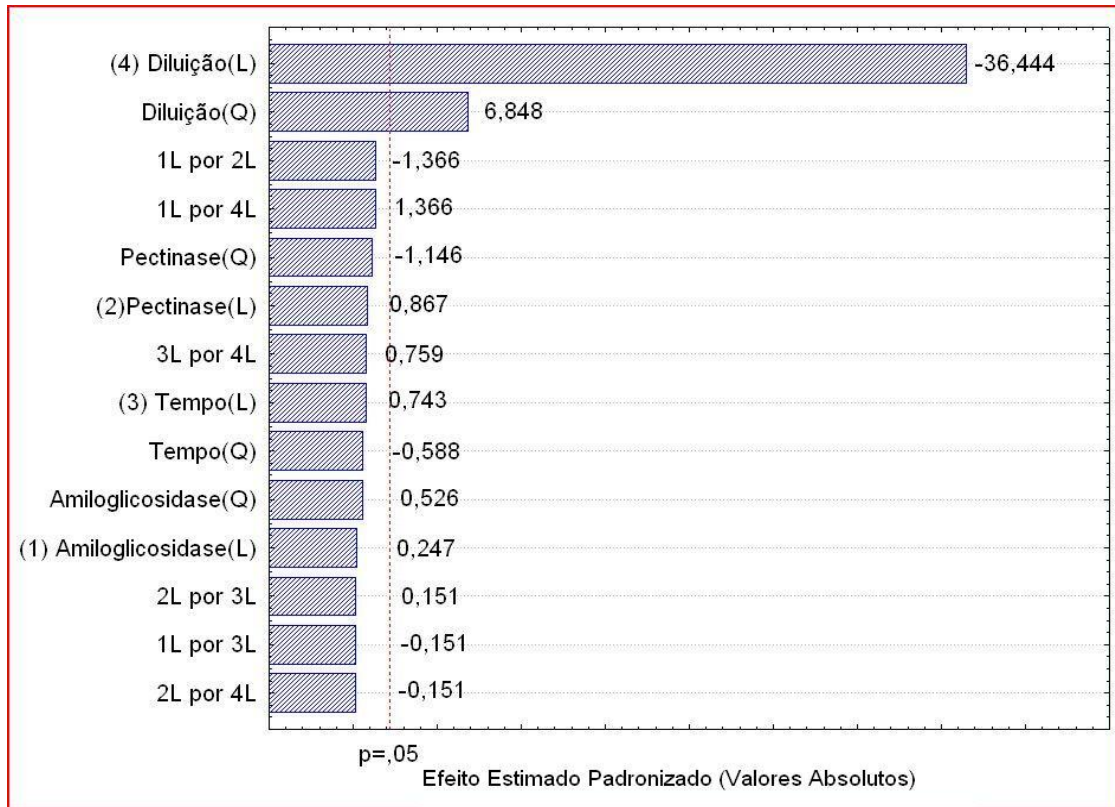


Figura 9 - Diagrama de Pareto para a resposta Brix.

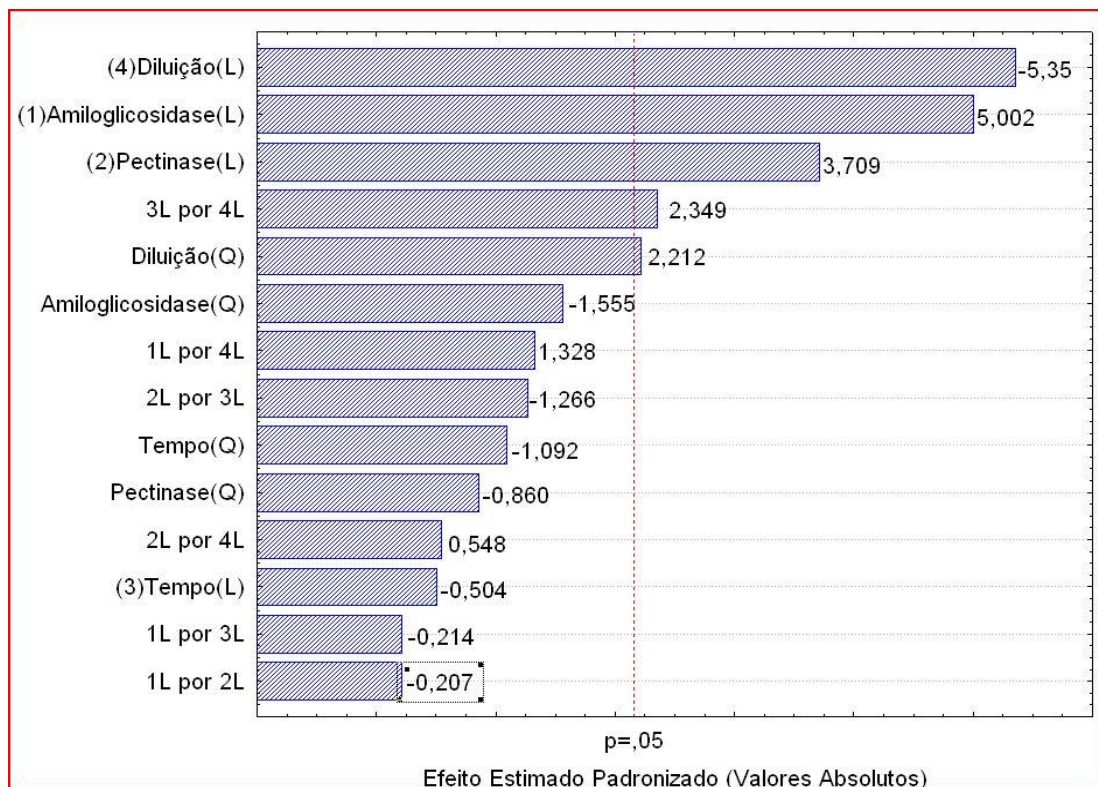


Figura 10 - Diagrama de Pareto para a resposta Eficiência da hidrólise.

### 4.3 Discussão das análises do hidrolisado de mandioca

#### 4.3.1 Açúcares Redutores

Através da Tabela 10 é possível fazer um estudo mais detalhado do valores obtidos experimentalmente pra cada grupo de variáveis. Como o ensaio 3, onde foi utilizado uma solução com 12% de amido, amiloglicosidase na dosagem de  $0,52\mu\text{L/g}$  de amido, pectinase na dosagem de  $7,05\mu\text{L/g}$  mat seca, alfa-alimase na dosagem de  $0,8\mu\text{L/g}$  de amido e um tempo de 21 horas onde obtem-se um Açúcar Redutor<sub>gerado</sub>(AR<sub>gerado</sub>) de  $118,2\text{g/L}$  (predito  $124,8\text{g/L}$ ).

No ensaio 8 tem-se uma maior concentração de Açúcar Redutor utilizando-se uma dosagem de amiloglicosidase de  $0,84\mu\text{L/g}$  de amido, pectinase na dosagem de  $7,05\mu\text{L/g}$  mat seca, alfa-alimase na dosagem de  $0,8\mu\text{L/g}$  de amido e um tempo de 55 horas, onde têm-se Açúcar Redutor de  $131,1\text{g/L}$ , (predito de  $123,7\text{g/L}$ ), que é bem plausível já que há uma maior dosagem de amiloglicosidase e um tempo maior, o que justifica a maior eficiência do processo. O mesmo acontece com os ensaios 9 e 14, que diferem na dosagem de amiloglicosidase e no tempo, que são maiores no ensaio 14 do que no ensaio 9, onde o ensaio 9 possui um Açúcar Redutor  $46,8\text{g/L}$  (predito  $51,4\text{g/L}$ ) enquanto o ensaio 14 possui um Açúcar Redutor  $83,4\text{g/L}$  (predito  $74\text{g/L}$ ). Já os ensaios 17 e 18 são ensaio semelhantes, variando apenas no valor de amiloglicosidase que no ensaio 18 possui uma dosagem de  $1\mu\text{L/g}$  de amido e um Açúcar Redutor  $81,4\text{g/L}$  (predito  $92,7\text{g/L}$ ) enquanto o ensaio 17 possui uma dosagem de  $0,36\mu\text{L/g}$  de amido, e um Açúcar Redutor gerado  $72,27\text{g/L}$  (predito  $66,4\text{g/L}$ ) o que pode ter ocorrido por algum tipo de contaminação que fez com que o açúcar produzido tenha sido consumido, ou algum fator de inibição que não pode ser controlado.

Leonel e Cereda (1998) estudaram o farelo de mandioca, um subproduto da extração da fécula, como matéria prima para a obtenção de álcool, utilizando pectinase como enzima complementar às enzimas amilolíticas, concluindo que 86,31% do amido e 70,46% da matéria seca inicial foram hidrolisados neste processo, constatando, também, redução de 23,04% do conteúdo de fibras presentes no farelo inicial. Estes mesmos autores em outro estudo (LEONEL et. al., 2000) obtiverem cerca de 90% de hidrólise do amido inicial contido no farelo de mandioca, utilizando enzimas comerciais.

Leonel e Cereda (2000) avaliou a pectinase como enzima complementar, utilizando uma solução de farelo de mandioca de 3500g (p/p), contendo 12% de amido, adicionou a pectinase na proporção de 0,002% de massa seca, e adicionou enzimas amilolíticas, após 24 horas da adição da enzima sacarificante sob agitação um rendimento de 80% de açúcares totais, comparando com os resultados obtidos pelo presente trabalho, em condições semelhantes as apresentadas por Leonel e Cereda, obteve-se valores entre 80 e 100% de eficiência da hidrólise.

A hidrólise em duas etapas de 1kg (peso úmido) resíduos de mandioca sendo primeiramente hidrolisado por amiloglicosidase e alfa-amilase comercial deu 195g de glicose e 625g (peso úmido) de polpa de mandioca. A polpa de mandioca era mais utilizada como substrato para a produção de celulase. Em condições ideais, *Trichoderma reesei* produziu 1.679 unidades de endoglucanase da 625g de polpa de mandioca. Hidrólise da celulose de mandioca (4.318g úmido peso) por essa quantidade de endoglucanase resultou em 186g de açúcares redutores. Por este procedimento, mandioca resíduos liberados redução de açúcar 218,3 g/kg no prazo de 80h (KESORNSIT et. al., 2007).

#### 4.3.2 pH

O pH foi corrigido com HCl 1mol/L nos ensaios para valores entre 4,0 e 4,4, necessário para a ação da enzima amiloglicosidase, não ocorrendo alteração durante o processo de hidrólise em todas as amostras retiradas.

#### 4.3.3 Discussão para Brix

A Figura 11 mostra que os valores observados experimentalmente de °Brix estão bem próximos dos valores preditos pela equação, os valores dos ensaios que utilizaram iguais diluições apresentaram valores muito semelhantes, o que pode ser muito bem observado pela figura.



Estudando mais a fundo a Tabela 10 é possível observar que os ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, com Diluição de 1:1,4 (12% de amido) observou-se o valores entre 15 e 15,9°Brix. Nos ensaios 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28 com Diluição de 1:2 (9,8% de amido) valores entre 11,7 e 12,5°Brix. Os ensaios 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 com Diluição de 1:2,59 (8% de amido) valores entre 9,9 e 10,9°Brix. Já o ensaio 24 apresentou o menor valor de °Brix, 9,4°Brix, com Diluição de 1:3 (7,3% de amido).

Cereda (2005) realizou a hidrólise do amido de mandioca testando dois tipos de enzimas liquificantes comerciais e uma enzima sacarificante, a massa realada de mandioca foi diluída na proporção massa ralada/água 1:2, após a hidrólise obteve um Brix de 20 a 23, nessas proporções de massa ralada/água, no presente trabalhos os valores de Brix ficaram entre 10 e 13°Brix.

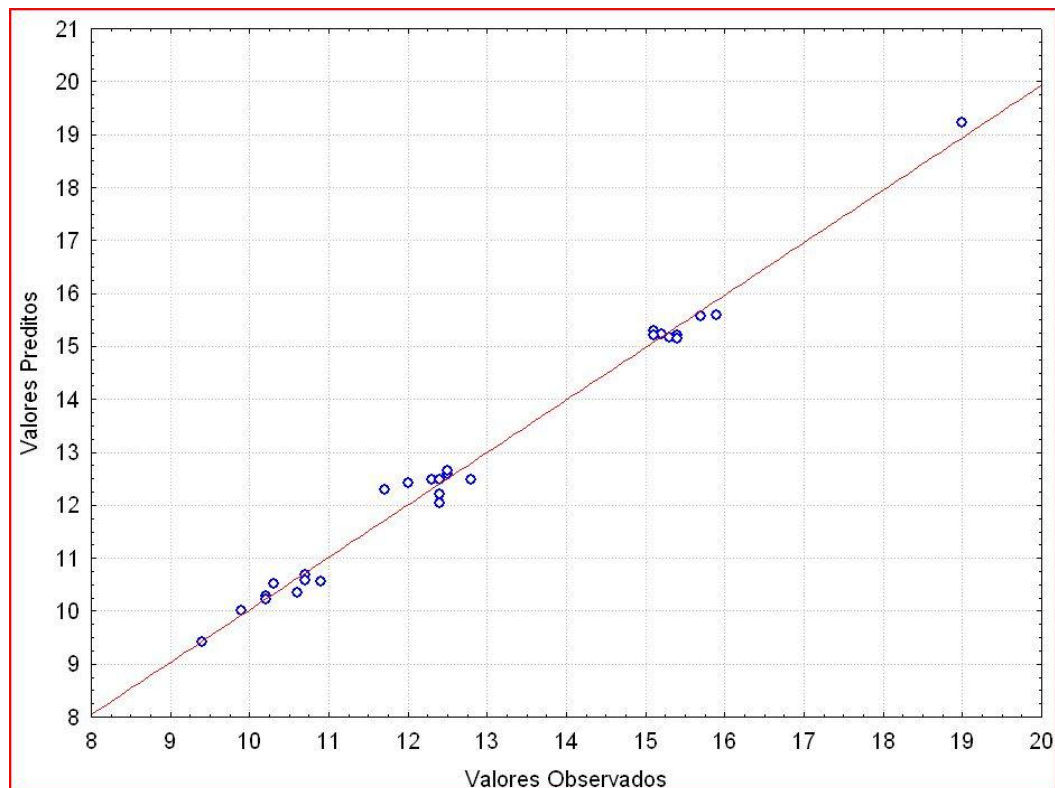


Figura 11 - Valores observados em função dos valores preditos para a resposta Brix.

Leonel e Cereda (2000) avaliou a pectinase como enzima complementar, utilizando uma solução de farelo de mandioca de 3500g (p/p), contendo 12% de amido, adicionou a pectinase na proporção de 0,002% de massa seca, e adicionou

enzimas amilolíticas, após 24 horas da adição da enzima sacarificante sob agitação, obteve um mosto com teor de 13°Brix, no presente trabalho para os parâmetros semelhantes aos utilizados por Leonel e Cereda, os valores de Brix foram próximos a 13, muito semelhantes ao encontrados por eles.

A Figura 12 mostra a interação da amiloglicosidase com a Diluição tendo como resposta °Brix, que os maiores valores de °Brix encontram-se nas menores diluições de massa (1:1, 14% de amido), independente da dosagem de amiloglicosidase, já os menores valores encontram-se nas maiores diluições da massa (1:2,59 e 1:3) e menores dosagens de amiloglicosidase (0,36 a 0,52 mg/g de amido).

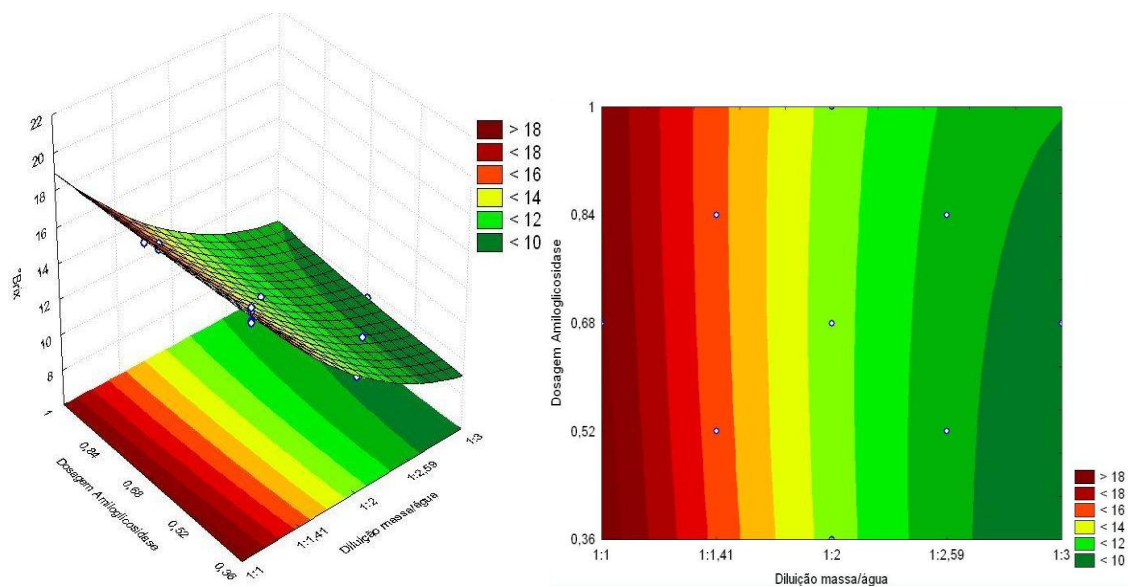


Figura 12 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a °Brix em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e a Diluição.

Já na Figura 13, observa-se que o °Brix em função da interação de Diluição e Pectinase os menores valores de °Brix encontram-se nas maiores diluições (1:2,59 e 1:3), independente do valor de pectinase, e os maiores valores de °Brix nas menores diluições da massa ( 1:1, 14% de amido) independentemente das dosagens de pectinase.

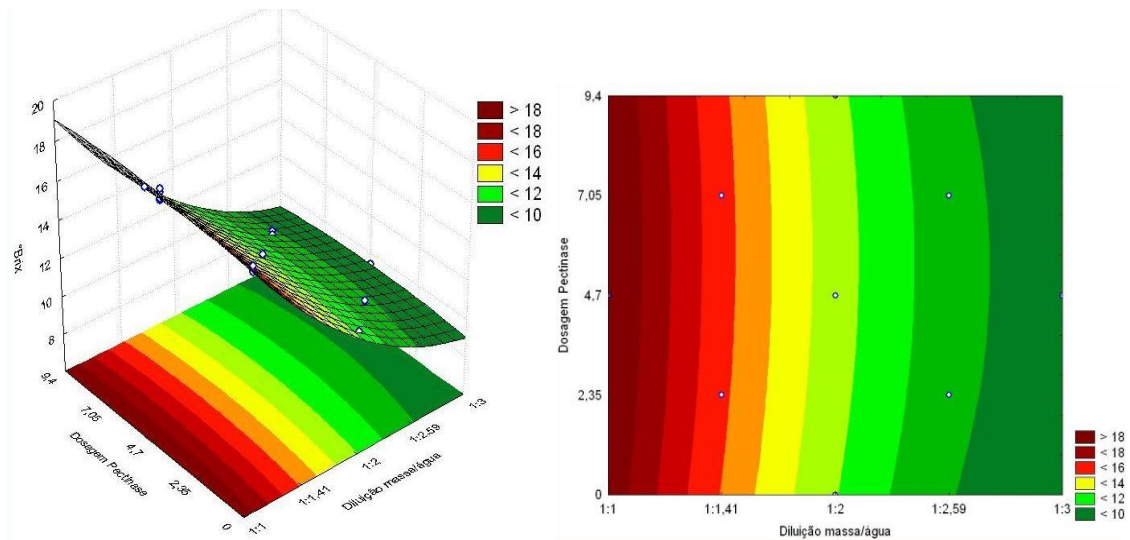


Figura 13 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a °Brix em função da Diluição e a pectinase ( $\mu\text{L/g}$  de mat. seca).

Na Figura 14, observa-se que o °Brix em função da interação de Diluição e o tempo apresenta o mesmo comportamento que nos outros 3 casos, os menores valores de °Brix encontram-se nas maiores diluições (1:2,59 e 1:3), independente do tempo de hidrólise, e os maiores valores de °Brix nas menores diluições da massa (1:1, 14% de amido) independentemente do tempo de hidrólise.

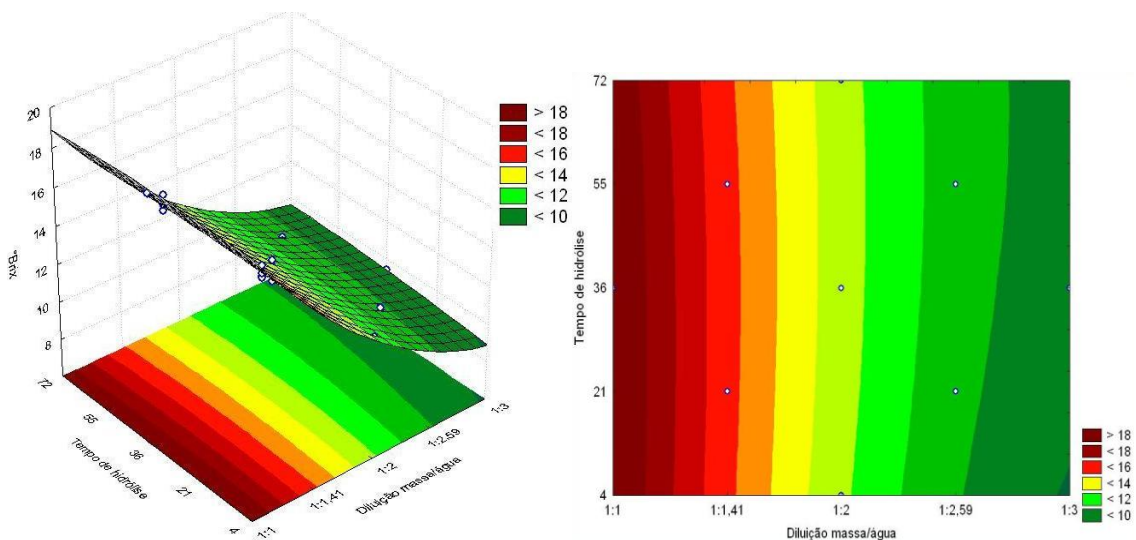


Figura 14 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a °Brix em função da Diluição e o tempo (horas após a adição da última enzima).

A Figura 15 demonstra muito bem o comportamento do Brix durante o processo de hidrólise, como é sabido o amido é pouco solúvel em água, logo é possível observar que o houve um grande aumento na quantidade de sólidos solúveis nas primeiras 2 horas, durante a ação da pectinase e  $\alpha$ -amilase, pois nesta etapa já há uma quebra significativa do amido em dextrinas, e outros tipos de estruturas solúveis, com a adição da amiloglicosidase (após 3 horas de experimento), pode-se observar que apesar da quebra em glicose, os valores de sólidos solúveis mantêm-se praticamente constantes. Para a construção desta figura foram agrupados os ensaios de acordo com a diluição, sendo um ensaio na diluição com nível -2, em que se utilizou a diluição de 1:1, dois ensaios com nível -1, em que utilizou a diluição 1:1,41, e um ensaio com nível +1, em que se utilizou a diluição 1:1,2. Sendo possível observar também a diferença de valores para as diferentes diluições, onde a maior quantidade de Brix (19°Brix) encontra-se no ensaio 23, em que foi utilizada a diluição 1:1, num nível intermediário, 15°Brix, encontram-se os ensaios em que foi utilizada a diluição 1:1,41, e os menores valores são encontrados nos ensaios em que se utilizou as maiois diluições, valores próximos de 10°Brix.

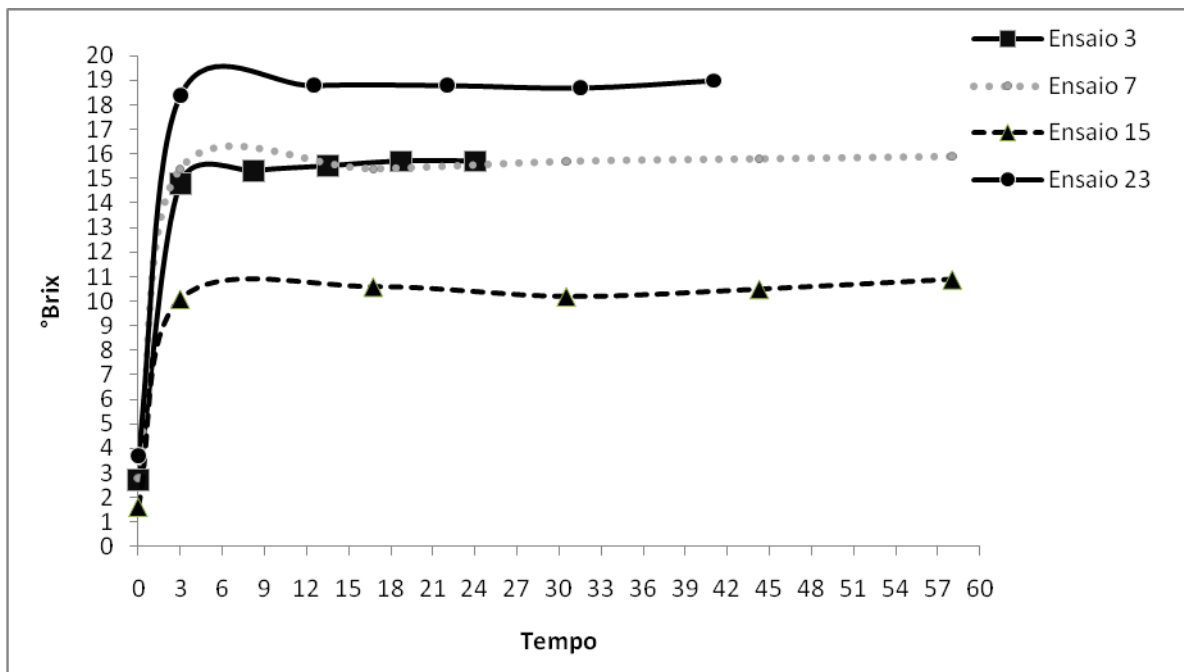


Figura 15– Comportamento do Brix durante o processo de hidrólise do amido.

#### 4.3.4 Discussão para a resposta Eficiência da hidrólise

Através da Figura 16 pode-se observar que os valores experimentais estão próximos dos valores preditos, não havendo grande discrepância entre os valores. Desse modo pode-se inferir que o modelo quadrático prediz adequadamente a conversão de amido em açúcares redutores.

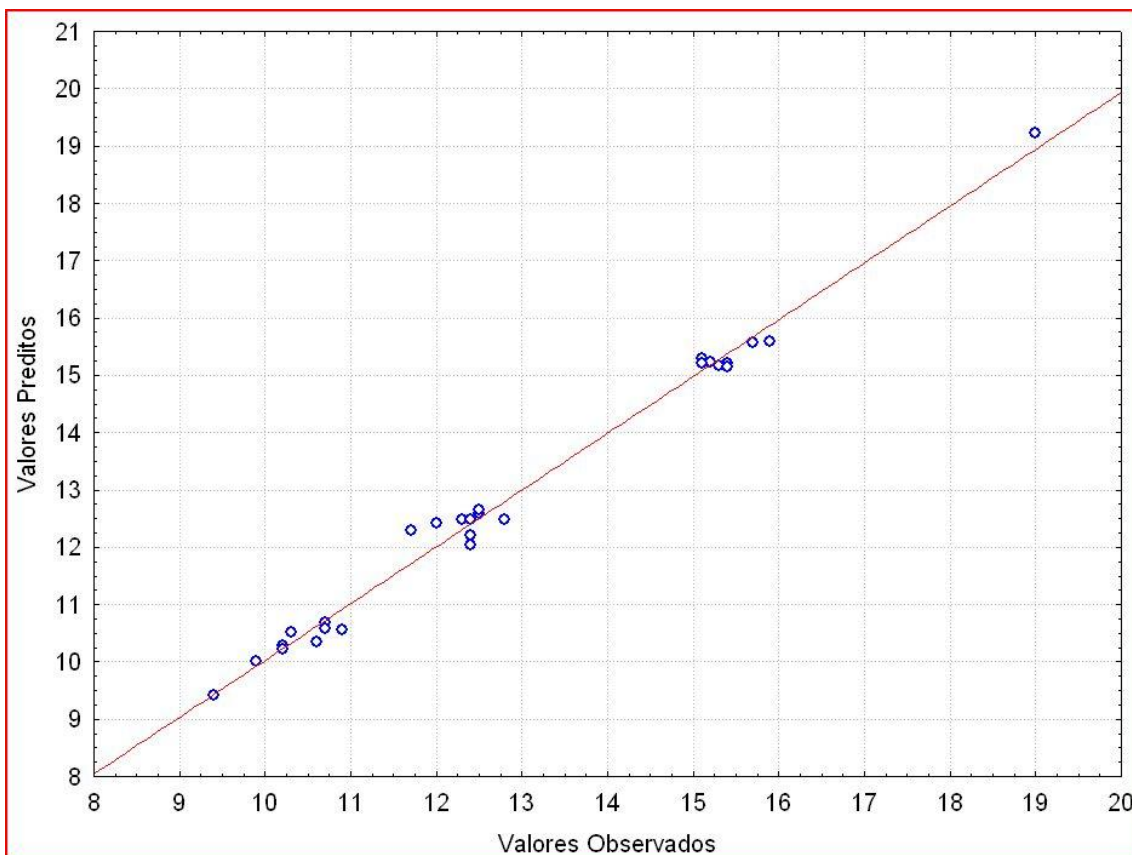


Figura 16 – Valores observados em função dos valores preditos para a resposta Eficiência da hidrólise.

Observando a Tabela 10, alguns ensaios tiveram resultados muito menores e muito maiores que o predito, como pode-se ver no ensaio 3, onde foi utilizado uma Diluição 1:1,41, com 12% de amido, amiloglicosidase na dosagem de 0,52 $\mu$ L/g de amido, pectinase na dosagem de 7,05 $\mu$ L/g mat seca, alfa-alimase na dosagem de 0,8 $\mu$ L/g de amido e um tempo de 21 horas onde obtem-se uma eficiência de 87,6%

sendo que o predito estatisticamente seria 94,5%, um dos possíveis motivos para essa diferença seria a má homogeneização na solução na retirada da amostra, ou interferentes externos, algum fator de inibição que não pôde ser controlado.

O ensaio 8 tem-se uma maior eficiência utilizando-se uma dosagem de amiloglicosidase de 0,84  $\mu\text{L/g}$  de amido, pectinase na dosagem de 7,05  $\mu\text{L/g}$  mat seca, alfa-amilase na dosagem de 0,8  $\mu\text{L/g}$  de amido e um tempo de 55 horas, onde têm-se uma eficiência de 97,26%, sendo maior que seu valor predito 90%, o que é bem plausível já que há uma maior dosagem de amiloglicosidase e um tempo maior, justifica a maior eficiência do processo.

O mesmo acontece com os ensaios 9 e 14, que diferem na dosagem de amiloglicosidase e no tempo, que são maiores no ensaio 14 do que no ensaio 9, onde o ensaio 9 possui uma eficiência de 51,74% (predito 56,94%) enquanto o ensaio 14 possui uma eficiência de 92,2% (predito 83,4%).

Os ensaios 17 e 18 são experimentos semelhantes, variando apenas o valor de amiloglicosidase que no ensaio 18 possui uma dosagem de 1  $\mu\text{L/g}$  de amido e uma eficiência de 66,69% (predito 60,8%) enquanto o ensaio 17 possui uma dosagem de 0,36  $\mu\text{L/g}$  de amido, e uma eficiência de 75,15% (predito 85,3%) o que pode ter ocorrido por algum tipo de contaminação que fez com que o açúcar produzido tenha sido consumido, ou algum fator de inibição que não pôde ser controlado.

O ensaio 14 foi o que apresentou a maior eficiência, sendo o valor do observado maior que o predito, neste ensaio foi utilizados os valores de Diluição de 1:2,59, amiloglicosidase 0,84  $\mu\text{L/g}$  de amido, pectinase 2,35  $\mu\text{L/g}$  de mat. seca e o tempo de 55 h.

Ferreira (et. al., 2006) em seu trabalho tratou o amido de mandioca com amilases do Malte de Milho, onde manteve constante a quantidade de amilase 5 g/L de malte de milho, e concentração de amido 11%, variando a temperatura (60, 65 e 70°C) e a concentração (9, 10 11% de amido), encontrando os melhores rendimentos de hidrólise, para tempos entre 20 e 30 h, com a temperatura de 65 °C para quaisquer concentrações de amido, conseguindo atingir valores de rendimento acima de 30%, o presente trabalho apresentou eficiências de hidrólise sempre acima de 50%, para quaisquer parâmetros.

Leonel e Cereda (1998) avaliaram a concentração de pectinase em processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca, onde mostraram que a mínima



concentração de pectinase, para um bom rendimento do processo, foi de 8kg enzima/t fibra, com 89,4% de amido hidrolisado, mantendo todos os outros fatores constantes.

A Figura 17 mostra que as maiores eficiências foram obtidas em experimentos onde utilizou - se as menores diluições (1:1 a 1:1,41 mandioca/água) com entre 14% a 11% de amido e valores de dosagem de amiloglicosidase entre 0,84 a 1 mg/g de amido. As menores eficiências foram encontradas nas maiores diluições da massa de mandioca e menores dosagens de amiloglicosidase.

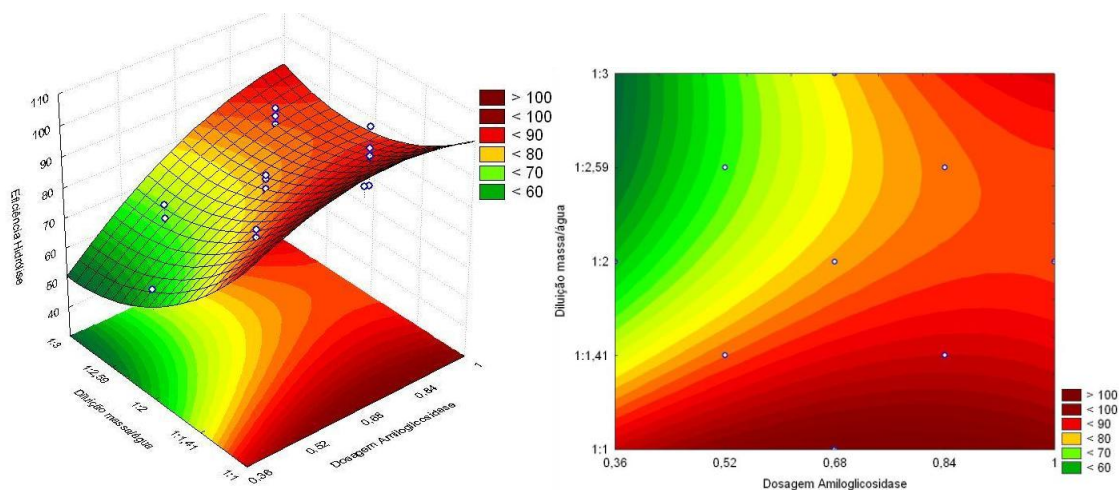


Figura 17 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e Diluição.

A Figura 18 mostra a interação da amiloglicosidase e o tempo, tendo como resposta a eficiência, mostra que os maiores valores de eficiência encontram-se nas maiores dosagens de amiloglicosidase, onde o tempo só começa a interferir na eficiência entre as dosagens de amiloglicosidase 0,84 e 1 mg/g de amido, apresentando as maiores eficiências com tempos entre 4 e 21 horas e tempos entre 55 e 72 horas. As menores eficiências encontram-se nas menores dosagens de amiloglicosidase indiferente ao tempo.

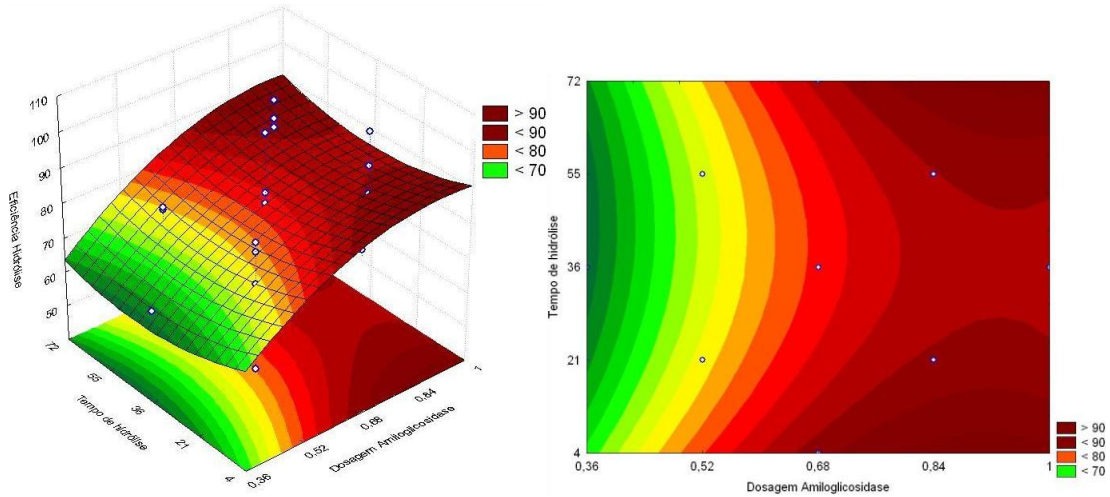


Figura 18 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e o tempo (horas após a adição da última enzima).

Na Figura 19 é possível observar a interação da amiloglicosidase e pectinase, onde a eficiência apresenta os menores valores nas menores dosagens de amiloglicosidase (0,36 mg/g de amido) e pectinase (0  $\mu$ L/g de mat. seca), já os maiores valores de eficiência são observados nas maiores dosagens de amiloglicosidase (0,84 a 1mg/g de amido) e pectinase (7,05 a 9,4  $\mu$ L/g de mat. seca).

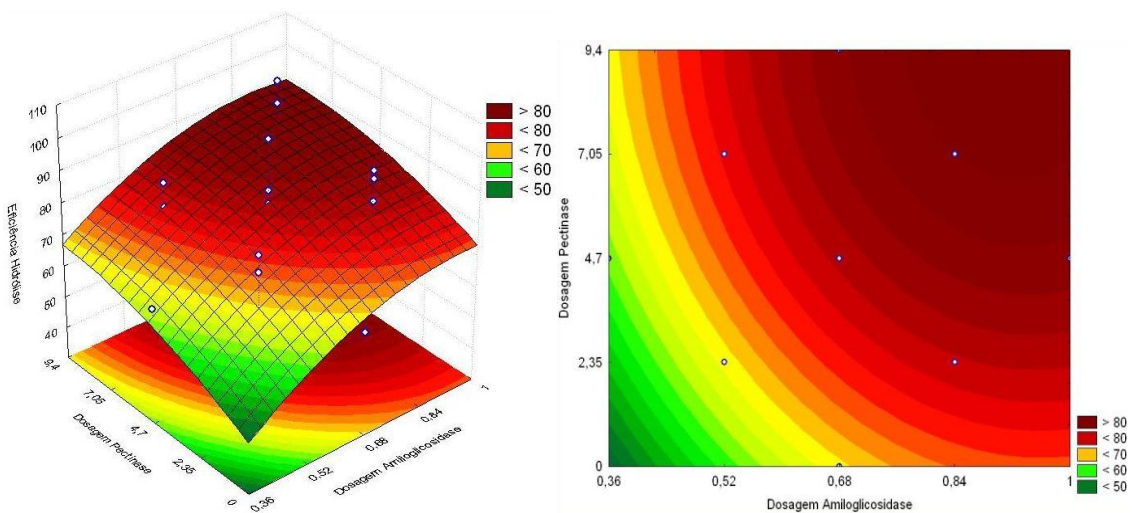


Figura 19 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência em função da amiloglicosidase (mg/g de amido) e pectinase ( $\mu$ L/g de mat. seca).



A Figura 20 mostra a interação da Diluição e o tempo. Pode ser observado que os maiores valores de eficiência encontram-se nos menores tempos (4 horas) com as menores diluições (1:1, 14% de amido), já os menores valores são encontrados qdo utiliza-se as maiores diluições (1:3) e os menores tempos (4 horas), o que mostra que o tempo não possui influência significativa, pois a eficiência da hidrólise está mais relacionada como a Diluição, o que já vem sendo explicado no trabalho.

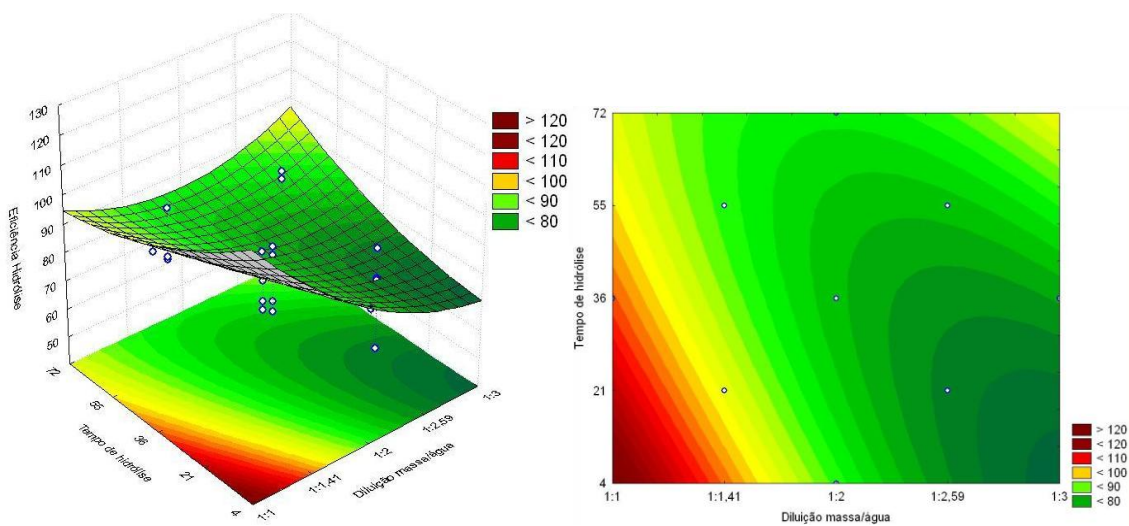


Figura 20 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da Diluição e o tempo (horas após a adição da última enzima).

Já a Figura 21 mostra a interação do tempo e Pectinase, onde encontramos as maiores eficiências quando se utiliza as maiores dosagens de pectinase (7,05 e 9,4  $\mu\text{L/g}$  mat. seca) em função do menor tempo (4 h). Já os menores valores de eficiência encontram-se na menor dosagem de pectinase (0  $\mu\text{L/g}$  mat. seca) e menores tempos (4 a 21 horas).

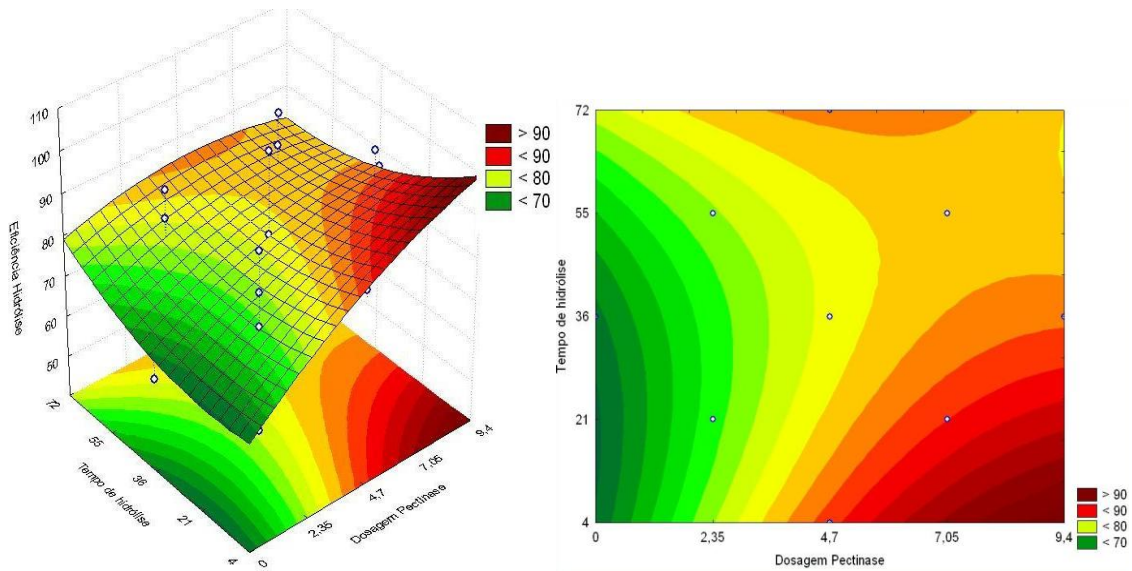


Figura 21 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da pectinase ( $\mu\text{L/g}$  de mat. seca) e o tempo (horas após a adição da última enzima).

A Figura 22 mostram a eficiência em relação a interação da Diluição e pectinase onde os menores valores de eficiência foram encontrados nas maiores diluições ( 1:2,59 e 1:3) com a menor dosagem de pectinase (0  $\mu\text{L/g}$  mat. seca), já os maiores valores de eficiência encontram-se nas menores diluições ( 1:1,14 e 1:1) e maiores dosagens de pectinase (4,7 a 9,4  $\mu\text{L/g}$  mat. seca).

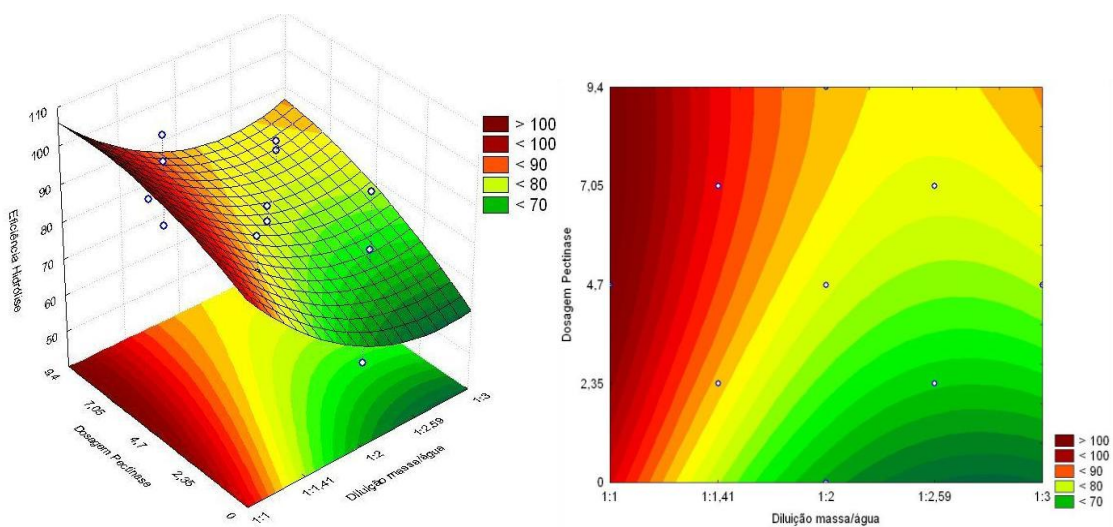


Figura 22 – Superfícies de respostas (a) e curvas de contorno (b) para a Eficiência da hidrólise em função da Diluição e a pectinase ( $\mu\text{L/g}$  de mat. seca).

Através da Figura 23, pode-se observar a desejabilidade do modelo proposto. A Figura 23 mostra os valores de cada variável independente de forma que quando os valores se aproximam de 1 (valor máximo) pode-se inferir que esse valor seria o valor ótimo para um maior eficiência da hidrólise. Deste modo, pode-se deduzir então que os valores recomendados para a maior eficiência do processo de hidrólise são o valor de 0,84 a 1mg/g de amido para amiloglicosidase, o valor entre 7,05 e 9,4  $\mu\text{L/g}$  mat. seca para pectinase, e o valor Diluição entre 1:1 e 1:1,41, ou seja 14% a 11% de amido para a Diluição da massa, irá se obter a melhor eficiência em relação ao tempo obtêm-se resultados semelhantes com a utilização de 4 a 21horas de hidrólise, ficando-se como menor valor em função de custos e operacionalidade do processo.

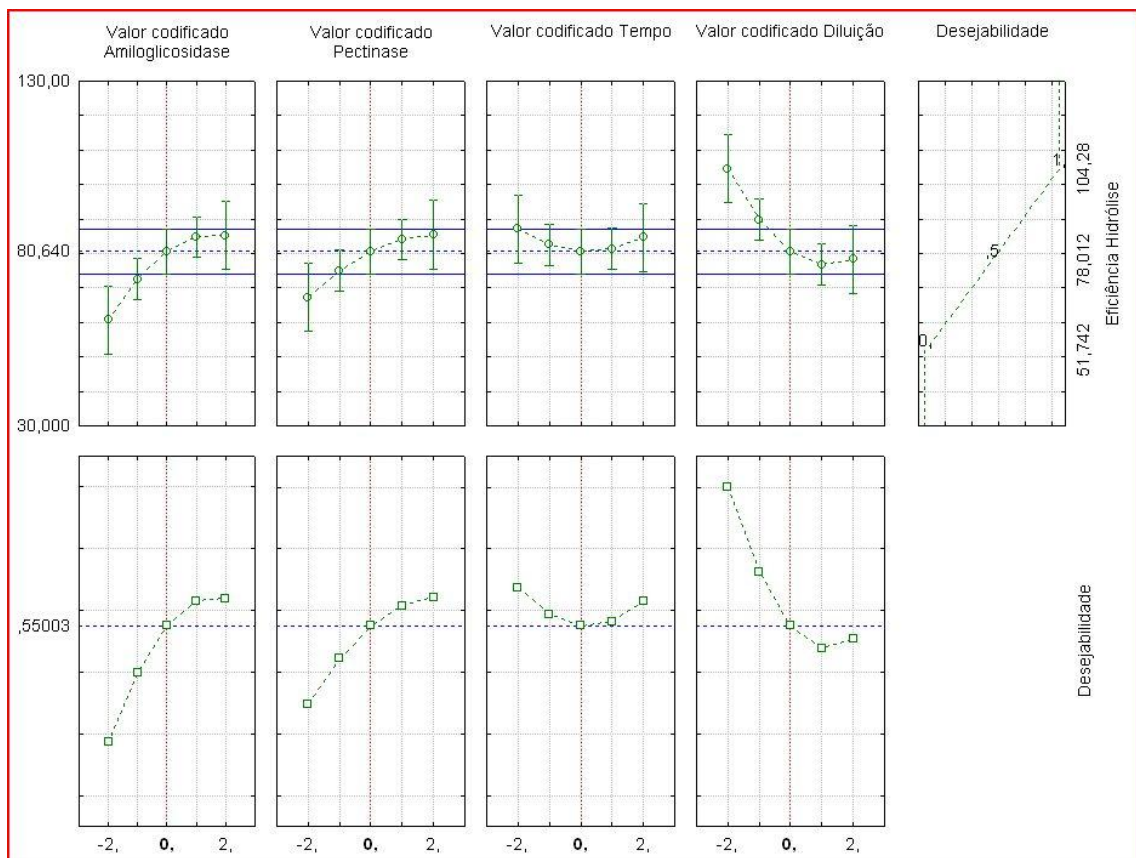


Figura 23 – Perfis dos valores preditos e desejabilidade para a resposta Eficiência da hidrólise.

A Figura 24 mostra o comportamento dos ensaios durante a hidrólise do amido. É possível observar que após a adição das duas primeiras enzimas, tempo até 3 horas, houve um aumento nos valores de eficiência, sendo 4 – 5 horas após a ação da amiloglicosidase já foi possível obter-se os maiores valores de eficiência para os diferentes ensaios, mantendo-se praticamente sem alterações durante o resto do tempo do experimento. Esse comportamento pode ser observado em todos os ensaios, independente da variação dos níveis das variáveis.

Tendo o ensaio 4, em que se utilizou a diluição 1:1,41, dosagem de  $\alpha$ -amilase 0,8 $\mu$ L/g amido, dosagem de amiloglicosidase 0,84 $\mu$ L/g amido, dosagem de pectinase 7,05 $\mu$ L/g mat. seca e tempo (após a adição da última enzima) de 21 horas, juntamente como ensaio 23 que utilizou diluição 1:1, dosagem de  $\alpha$ -amilase 0,8 $\mu$ L/g amido, dosagem de amiloglicosidase 0,68  $\mu$ L/g amido, dosagem de pectinase 4,7  $\mu$ L/g mat. seca e tempo (após a adição da última enzima) de 38 horas, obtiveram a maior eficiência de hidrólise do amido da mandioca.

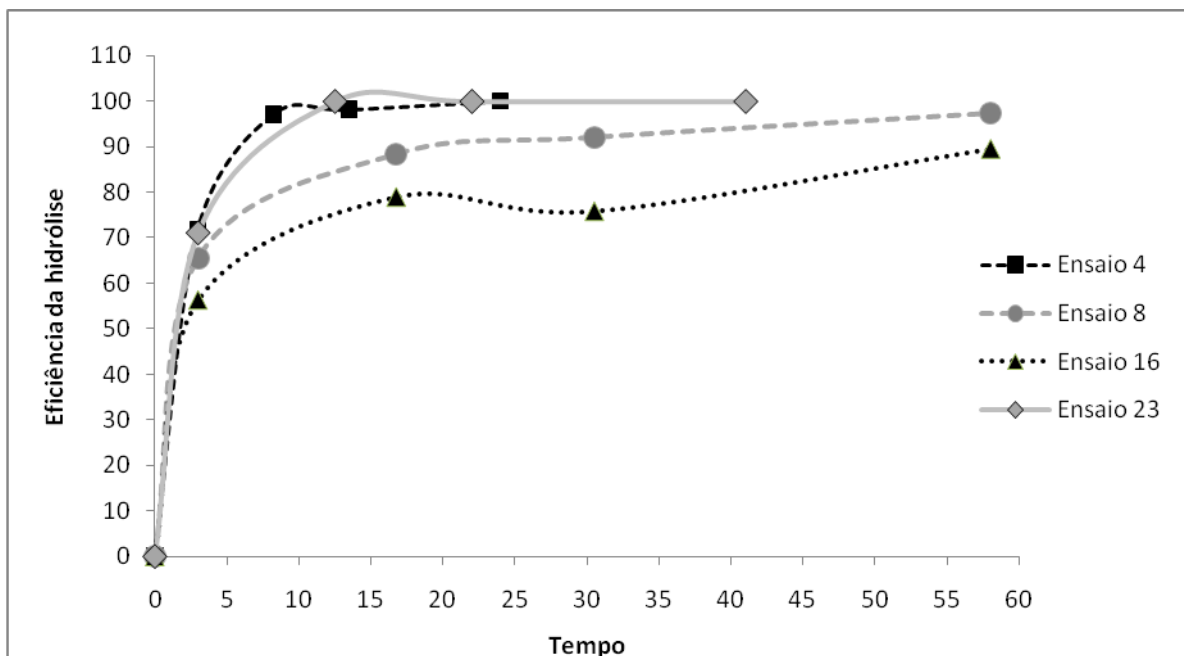


Figura 24 - Comportamento da Eficiência durante processo de hidrólise do amido.

#### 4.3.5 Discussão para a resposta Amido hidrolisado

A Tabela 13 mostra os valores de Amido inicial, Amido Hidrolisado e Amido hidrolisado prevista, avaliando os valores observados pelos preditos pode-se ver que não há muita discrepância entre os valores, exceto os ensaios 3, 8, 14, 17 e 18, sendo que os ensaios 8, 14 e 17 apresentaram valores de Amido hidrolisado observado maiores que o predito, já o ensaio 3 apresentara valor de amido hidrolisado observado menor que o predito.

Já avaliando os valores de Amido inicial pelo Amido observado experimentalmente pode-se observar que alguns ensaios obtiveram valores superiores a 100% em relação ao rendimento de glicose, fato esse decorrente também devido à presença de amidos fragmentados, como, dextrinas e outras substâncias sensíveis à ação das enzimas amilolíticas utilizadas no processo (CAMILI et. al., 2006).

Comparando os ensaios realizados com a mesma Diluição, foi possível observar que a dosagem de amiloglicosidase foi, na maioria dos casos, determinante para a maior obtenção de amido hidrolisado, isso pode ser melhor observado nos experimentos em que utilizou-se a Diluição 1:1,41, com a dosagem de 0,84mg/g de amido de amiloglicosidase. Para a Diluição 1:1,41, levando-se em consideração o tempo, o maior valor de amido hidrolisado foi encontrado no ensaio onde utilizou-se amiloglicosidase na dosagem de 0,84mg/g de amido, pectinase na dosagem de 7,05 $\mu$ L/g mat. seca de com o tempo de 55 horas, a segundo maior valor de amido hidrolisado pode ser observado no ensaio em que utilizou-se amiloglicosidase na dosagem de 0,84mg/g de amido, pectinase na dosagem de 7,05 $\mu$ L/g mat. seca com o tempo de 21 horas, mais uma vez mostrando a dependencia da hidrólise para com a enzima amiloglicosidase.

Já nos ensaios utilizaram a Diluição 1:2,59 os maiores valores de amido hidrolisado encontraram-se nos ensaio em que se utilizou amiloglicosidase na dosagem de 0,84mg/g de amido e pectinase na dosagem de 7,05 $\mu$ L/g mat. seca para ambos os tempos (21 e 55 horas).

Tabela 13 – Amido inicial, Amido hidrolisado observado, Predito.

Ensaio	Amido inicial (g/L)	Amido hidrolisado observado (g/L)	Amido hidrolisado predito (g/L)
1	121,49	103,17	100,92
2	121,49	114,98	111,21
3	121,49	106,98	112,32
4	121,49	126,56	123,4
5	121,49	96,59	94,3
6	121,49	103,54	105,3
7	121,49	97,53	99,59
8	121,49	118,05	111,35
9	81,53	42,14	46,29
10	81,53	62,56	58,17
11	81,53	61,94	57,88
12	81,53	70,82	70,55
13	81,53	53,22	54,05
14	81,53	75,1	66,61
15	81,53	58,29	59,52
16	81,53	72,95	72,87
17	97,63	65,05	59,8
18	97,63	73,3	83,43
19	97,63	61,31	66,1
20	97,63	83,68	83,43
21	97,63	84,92	86,39
22	97,63	78,69	82,1
23	146,37	150,04	151,8
24	73,18	55,63	58,7
25	97,63	78,76	78,65
26	97,63	80,86	78,65
27	97,63	76,78	78,65
28	97,63	78,19	78,65

Leonel e Cereda (2000) avaliaram a pectinase como enzima complementar, utilizando uma solução de farelo de mandioca de 3500g (p/p), contendo 12% de amido, adicionou a pectinase na proporção de 0,002% de massa seca, e adicionou enzimas amilolíticas, após 24 horas da adição da enzima sacarificante sob agitação, com a hidrólise de 86,31% do amido inicial, sendo que, no presente trabalho, em condições experimentais semelhantes a hidrólise do amido inicial variou entre 79 e 100%.

#### 4.3.6 Determinação do teor de etanol teórico

Através da equação 2 foi possível montar a Tabela 14, que mostra a quantidade de Etanol <sub>teórico</sub>, sabendo que a relação de conversão de ART em etanol é 0,511.

Os valores de rendimentos teóricos são muito difíceis de se encontrar na prática, devido à utilização de substrato para outra função da célula (responsável pela fermentação do substrato) ou contaminação, por exemplo (SANTANA, 2007).

Srinorakutara et. al. (2004 apud SANTANA, 2007), que encontraram uma concentração de etanol de 36,2 g/L, correspondente a 91% do rendimento teórico depois de 24 horas de fermentação, a uma concentração inicial de açúcares redutores de 89,2 g/L, oriundo de resíduo de amido de mandioca hidrolisado com as enzimas celulase e pectinase num tratamento preliminar do resíduo, seguindo a utilização de uma  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase.

Tabela 14 – Etanol teórico em relação ao AR<sub>gerado</sub> e Amido Hidrolisado

Ensaio	AR <sub>gerado</sub> (g/L)	Amido hidrolisado (g/L)	Etanol teórico (g/L)
1	114,63	103,17	58,58
2	127,75	114,98	65,28
3	118,2	106,98	60,40
4	140,62	126,56	71,86
5	107,33	96,59	54,85
6	115,05	103,54	58,79
7	108,37	97,53	55,38
8	131,16	118,05	67,02
9	46,82	42,14	23,93
10	69,51	62,56	35,52
11	68,82	61,94	35,17
12	78,69	70,82	40,21
13	59,12	53,22	30,21
14	83,44	75,1	42,64
15	64,77	58,29	33,10
16	81,05	72,95	41,42
17	72,27	65,05	36,93
18	81,45	73,3	41,62
19	68,12	61,31	34,81
20	92,97	83,68	47,51
21	94,36	84,92	48,22
22	87,43	78,69	44,68
23	166,71	150,04	85,19
24	61,81	55,63	31,58
25	87,51	78,76	44,72
26	89,85	80,86	45,91
27	85,31	76,78	43,59
28	86,88	78,19	44,40

No trabalho realizado por Amutha et. al. (2001) onde estudaram as células co-imobilizados produziram 46,7g/L de etanol a partir de 150g/l de amido de mandioca liquefeito, enquanto células de levedura imobilizadas *S. Diastaticus* produzidos 37,5g/L de etanol. A concentração de etanol produzido por células imobilizadas foi maior do que por células livres de *S. diastaticus* e *Z. mobilis* na cultura mista de fermentação. Na fermentação foram feitos repetidas lotes usando células co-



imobilizada, a concentração de etanol aumentou para 53,5g/L. As enzimas co-imobilizada em gel foram estáveis até sete lotes consecutivos. Fermentação contínua utilizando co-imobilizada células em um reator de leito coluna operado a uma vazão de 15mL/h (tempo de residência, 4h) apresentaram uma produtividade de etanol máximo de 8,9 g/L/h.

Segundo Venturini Filho e Mendes (2003) alguns cuidados devem ser tomados quanto à concentração de sólidos solúveis, açúcares totais, acidez total e pH no mosto para que a fermentação ocorra de forma satisfatória e, às vezes, torna-se necessária uma suplementação com nutrientes.

No estudo de Azevedo et. al. (2007) foi observado que o mosto do caqui propiciou uma fermentação e encontrou a maior concentração de etanol após 48 horas de fermentação, contendo a cepa de *S. cerevisiae*, foi obtida quando se utilizou mosto com 12°Brix, com valor de 6,57 g.L<sup>-1</sup> de etanol, sem a adição de nutrientes, resultante da presença de vitaminas e açúcares. Os resultados demonstraram a viabilidade de obtenção de álcool etílico a partir de mosto de frutos de caqui, sendo que o inóculo, sólidos solúveis e pH inicial não foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância na produção de álcool.

#### 4.3.7 Ação da Pectinase

Dentre os ensaios realizados, observando-se a ação da pectinase em separado, comparando-se aquele sem pectinase (ensaio 19), com outros (ensaios 25, 26, 27 e 28) que foram realizados com os mesmos parâmetros como Diluição da solução mandioca/água, dosagem de amiloglicosidase e tempo de hidrólise, apenas variando-se a quantidade de pectinase, pode-se observar que em relação ao  $AR_{gerado}$ , Eficiência da hidrólise e quantidade de Amido hidrolisado, houve um aumento de 20% nos ensaios em que foi utilizado pectinase.

Como pode-se observar no ensaio em que não foi utilizado pectinase obteve-se 68,12 g/L de  $AR_{gerado}$ , 62,85% de Eficiência da hidrólise e 61,31 g/L de Amido hidrolisado. Já os ensaios que utilizaram uma dosagem de 4,7µL/g mat. seca de pectinase, obteve-se uma média de 87g/L de  $AR_{gerado}$ , 80% de Eficiência da hidrólise e 78 g/L de Amido hidrolisado. O ensaio em que se utilizou 9,4µL/g mat. seca de

pectinase, obteve-se de 92,97g/L de  $AR_{gerado}$ , 85,07% de Eficiência da hidrólise e 83,68 g/L de Amido hidrolisado, mostrando que a presença da pectinase no processo de hidrólise do amido é de grande valia. Já em relação ao Brix a presença ou não da pectinase não alterou seu valor, ficando entre 11 e 12°Brix. Leonel (1998), também comprovou que a adição da pectinase como enzima auxiliar para o processo de hidrólise do amido de mandioca gera um aumento consideravel no valor de Açúcares redutores, na ordem de 30%, comparado com ensaios em que a enzima não foi adicionada.

## 5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pelos experimentos foi possível concluir que:

- A mandioca utilizada no trabalho mostrando-se bastante adequada para a obtenção de açúcares fermentescíveis, pois apresentou um bom teor de amido, 77%, disponível para a ação das enzimas amilolíticas;
- Os modelos estatísticos obtidos demonstraram-se adequados para todas as respostas desejadas que foram Eficiência da hidrólise, Brix e AR<sub>gerado</sub>, onde foi encontrado um modelo para cada resposta, sendo:

$AR_{gerado} = 87,39 + 6,56(A) + 4,9(P) - 25,86(D) + 7,39(D^2) + 3,99(TxD)$ , modelo para Açúcar Redutor gerado, com um  $r^2 = 0,94$ ;

$^{\circ}Brix = 12,74 - 2,45D + 0,46(D^2)$ , modelo para Brix, com um  $r^2 = 0,99$ ;

$Efic. da hidrólise = 80,64 + 6,11(A) + 4,53(P) - 6,54(D) + 2,7(D^2) + 3,51(TxD)$ , modelo para Eficiência da Hidrólise, com um  $r^2 = 0,87$ .

Sendo as variáveis codificadas A = amiloglicosidase, P = Pectinase, D = Relação sólido/líquido e T = tempo de hidrólise após a adição da última enzima.

- A maior eficiência da hidrólise foi de 100%, quando se utilizou os parâmetros: diluição 1:1,41 (mandioca/água),  $\alpha$ -amilase na dosagem de 0,8 $\mu$ L/g de amido, amiloglicosidase na dosagem de 0,84mg/g de amido, pectinase na dosagem de 7,05 $\mu$ L/g mat seca e com um tempo de 21 horas;
- O uso da pectinase como enzima auxiliar no processo de hidrólise do amido proporcionou um aumento no rendimento, comparando o ensaio em que houve ausência de pectinase (ensaio 19), com outros que foram realizados com os mesmos parâmetros (ensaios 25, 26, 27 e 28), apenas variando a quantidade de pectinase, foi possível observar os valores de AR<sub>gerado</sub>, Eficiência da hidrólise e quantidade de Amido hidrolisado, tiveram um aumento de 20% nos ensaios em que foi utilizado pectinase.
- O valor de etanol teórico (100% de rendimento) foi estimado a partir das quantidades de amido hidrolisado da mandioca, onde encontrou-se valores entre 31 a 85 g/L.

## 6 BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, M. M.; TAVARES, D. P. S. A.; ROCHA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; MOTA, J. C.; Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru, **Revist. Bras. De Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Vol 8, nº1, 35 – 42, 2006.

AMUTHA, K.; GUNASEKARAN, P.; Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zimomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol 92, nº6, 560 – 564, 2001.

APAR, D. K., OZBEK, B.,  $\alpha$ -Amilase inactivation during corn starch hydrolysis process, **Process Biochemistry**, Vol. 39, 1877 – 1892, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, 1994.

AZEVEDO, A. W. M.; DALLA SANTA, H. S.; ALVARES, D. C.; BASTOS, R.; RIGO, M.; DALLA SANTA, O. R.; Estudo da viabilidade de obtenção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de frutos de caqui (*Diospyros kaki* L.), **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.9 nº 2, Jul/Dez 2007

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Vol. 3, Campinas, Editora da Unicamp, 2007, 480p.

BILIARDERIS, C. G. The structure and interactions of starch with Food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. Vol. 69, 60 – 78, 1991.

BULEÓN, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 23, 82 – 112, 1998.

CAMILI, E. A.; PINTO, P. H. M.; URBANO, L. H.; SUMAN, P. A.; CABELLO, C.; Obtenção de etanol utilizando resíduo líquido (MANIPUEIRA) secado ao sol obtido em indústrias procesadoras de farinha de mandioca. **XIII Congresso Brasileiro de Mandioca**, 2009.

CEREDA, M. C., **Hidrólise enzimática de amido de mandioca para elaboração de álcool**, 2005.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O., **Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**, Série: Culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas, Vol 3, 2003.

CEREDA, M. P.; Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (coord.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill (Séries Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), capítulo 1, v. 4, p 13 – 37, 2001.

CHATAKANONDA, P.; CHINACHOTI, P.; SRIROTH, K.; PIYACHOMKWAN, K.; CHOTINEERANAT, S.; TANG, H.; HILLS, B.; The influence of time and conditions of harvest on the functional behaviour of cassava starch – a proton NMR relaxation study. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 53, 233 – 240, 2003.

CUNHA, S. M.; GUEDES, F. F.; JUNIOR, R. W.; PALMA, M. B.; Produção de etanol a partir de bagaço de mandioca hidrolisado por glucoamilase obtida por fermentação em estado sólido. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal, 2009.

CUSTÓDIO, T. N.; MORAIS, A. R. DE; MUNIZ, J. A.; **Superfície de resposta em experimentos com parciais subdivididas**. Ciência Agrotécnica, 24: 1008. 2000.

ÇINAR, I.; **Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids**. Universidade Kahramanmara Sütçü Imam. Turquia. 2003.

DALLAQUA, M. A. M.; CORAL, D. J.; Morfoanatomia. In: CEREDA, M. P., (coord) **Agricultura: cultura de tuberosas amiláceas latino americanas**, Vol 2, Cap 3, São Paulo, Fundação Cargill, 2002.

DELGADO, R.; CASTRO, A. J.; VÁZQUEZ, M.; A kinetic assesment of enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). **Food Science and Technology**, Vol 42, 797 – 804, 2009.

FERREIRA, G. B., MELO, V. V.; LOPES, F. L. G.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOUGI, E. B.; Produção de álcool a partir da hidrólise do amido de mandioca e amiloses de malte de milho. **Congresso Online – SODEBRAS**, 2006.

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: Cultura de tuberosas latino americana**, São Paulo, Fundação Cargill, Vol 1, 2001.

FREITAS, R. A.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; SIERAKOESKI, M. R.; Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Discorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. **Carbohydrate Polymers**, 2003.

GUNARATINE, A.; HOOVER, R.; Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 49, 425 – 437, 2002.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo, 1985.

IBGE, Anuário estatístico do Brasil, Rio de Janeiro, IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010.

KESORNSIT, J.; LEEPIPATPIBOON, N.; KITPRECHAVANITCH, V.; SRINORAKUTARA, T.; AKARACHARANYA, A.; Production of monomeric sugar from enzymatic hydrolysis of cassava waste. **The 2<sup>nd</sup> International Conference on “Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products”** (Fervaap), Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, 23 – 25 maio/2007.

KIMURA, A.; ROBYT, J. F.; Reaction of enzymes with starch granules: Kinetics and products of the reaction with glucoamylase. **Carbohydrate Research**, Vol. 277, 87 – 107, 2005.

LEONEL, M., **Uso de enzimas complementares na produção de etanol a partir de farelo de mandioca**. 1998. 118f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 1998.

LEONEL, M. & CEREDA, M. P. Avaliação técnico-econômico da produção de etanol de farelo de mandioca, utilizando pectinase como enzima complementar. **Energia na agroindústria**, Vol 13(2), 1 – 14, 2000.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; **Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares, no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol**. Botucatu-SP, 1998.

MARCON, M. J. A.; AVANCINI, S. R. P.; AMANTE, E. R., **Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo**. 101 p, Ed. Da UFSC, Florianópolis, 2007.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKUDA, C.; Cultivo da mandioca nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. **Série: Cultura de tuberosas latino americana**, São Paulo, Fundação Cargill, Vol 2, 2002.

PINELO, M. et al.; Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food and Bioproducts Processing**, Vol 88, 259 – 265, 2010.

RAKSHIT, S. K. **Recent trends in cassava starch production and application.** Tailândia, 2004.

ROCKARD, J. E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J. M. V.; The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, Vol. 31, 189 – 207, 1991.

RIZATO, M.; FELIPE, F.I.; Potencial econômico da produção de álcool de mandioca no norte do Brasil. **XIII Congresso Brasileiro de Mandioca**, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** 1ª Edição – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, T. H. S.; MARTINS, S. Q. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B., MACEDO, G. R.; Estudo do uso de Microondas no Pré-Tratamento Álcali da Fibra do Caju seguido de Hidrólise Enzimática. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal, 2009.

SANTANA, N. B.; **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**; Dissertação Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2007.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M.; Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, Vol. 23, 434 – 440, 2009.

SILVA, J. A.; da SILVA, F. L. H.; SANTANA, D. P.; ALVES, R. R. N.; Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica, **Química Nova**, Vol29, nº4, 695 – 698, 2006.



SILVA, J.A.; DAMASCENO, B.P.G.L.; da SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S.; SANTANA, D. P.; Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, Vol31, nº5, 1073 – 1077, 2008.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.; Hidrólise de Amido. In: Cereda, M. P., et. al.,(coord.). Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. **Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**, Vol 3, Fundação Cargill, 2003.

TAPARELLI, J. R.; **Modificação química do amido de mandioca e estudo da sua aplicação em revestimento couché**. 2005, 101p. Dissertação (Mestrado – Faculdade de Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M.; Pectinase: Aplicações industriais e perspectivas; **Quím. Nova**, Vol. 30, N°2, 388 – 394, 2007.

**UNITED STATES PATENT SITE:** <http://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/search-bool.html>, acessado em 10/06/2011, às 14h.

VAZ, L. G. L.; **Performance do processo de coagulação/floculação no tratamento do efluente líquido gerado na galvanoplastia**. 2009. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo. Toledo – PR, 2009, 83f.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P.; Fermentação Alcoólica de raízes tropicais. In: Cereda, M. P., et. al. (coord.). Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. **Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**, Vol 3, Fundação Cargill, 2003.