

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

KEROLIN KUPSKI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO DA MANIPUEIRA SEGUIDO
DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2018

KEROLIN KUPSKI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO DA MANIPUEIRA SEGUIDO
DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gracinda Marina Castelo da Silva

TOLEDO
2018

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

KEROLIN KUPSKI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO DA MANIPUEIRA SEGUIDO
DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof^a. Dr^a. GRACINDA MARINA CASTELO DA SILVA
Orientadora

Prof^a. CAMILA MORESCO
Banca

Prof^a. Dr^a. PRISCILA VAZ DE ARRUDA
Banca

Toledo, junho de 2018

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

Mas graças a Deus, que nos dá a vitória por meio de nosso Senhor Jesus Cristo. Portanto, meus amados irmãos, mantenham-se firmes, e que nada os abale. Sejam sempre dedicados à obra do Senhor, pois vocês sabem que, no Senhor, o trabalho de vocês não será inútil.

1 Coríntios 15:57-58

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e paciência em todos os momentos da minha graduação, por me guiar na elaboração deste trabalho, e me dado ânimo mesmo nos momentos mais difíceis.

Meus pais, meu irmão e minha vó, agradeço pelas palavras de incentivo e por sempre acreditarem na minha capacidade, não me deixando desistir ou desanimar no meio do caminho. Não sei o que faria sem vocês, obrigada pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva, agradeço muito pelo apoio e incentivo, pela paciência que teve comigo, por compartilhar seus conhecimentos e auxiliar durante todo o processo deste trabalho. Você com certeza é um grande exemplo de profissional e ser humano.

Meus agradecimentos vão também aos meus professores, que durante toda a graduação contribuíram na minha formação profissional e me deram base para chegar até o final do curso, sem vocês nada disso seria possível.

Sou grata aos técnicos e estagiários dos laboratórios da universidade, que me auxiliaram, de forma direta e indireta para a realização das análises.

Enfim, a todos que de alguma forma ou outra, contribuíram com a minha formação.

RESUMO

KUPSKI, Kerolin. **Estudo da hidrólise enzimática do amido da manipueira seguido da fermentação alcoólica.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

A industrialização da mandioca, gera entre resíduos sólidos e líquidos, a manipueira, um resíduo altamente poluente devido a sua grande carga orgânica, que causa sérios problemas quando lançada sem tratamento em corpos hídricos. O volume de manipueira produzido é estimado entre 2 a 3,6 m³ por tonelada de mandioca processada para produção de fécula. Uma das soluções para reaproveitar a manipueira é como matéria prima para a produção de etanol. Este trabalho objetivou avaliar a melhor condição para a hidrólise da manipueira pela ação da enzima amiloglicosidase que quebra a molécula do amido em açúcares menores, fermentescíveis. A hidrólise é necessária para a fermentação alcoólica porque as leveduras alcoólicas não possuem capacidade de agir diretamente sobre o amido, para isso foi necessária a ação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase. No desenvolvimento do presente trabalho, as amostras de manipueira foram submetidas a análises físico-químicas de pH, cinzas, umidade, açúcares redutores, proteínas, amido e análises de Brix, biomassa e determinação do álcool. Para a hidrólise do amido, manteve-se constante a dosagem de α -amilase (0,5 mL/L) em pH 6,5 e temperatura de 90°C por 2 horas, para todos os ensaios. A partir da primeira hidrólise, foram realizados três ensaios em triplicata, onde variou-se a concentração de amiloglicosidase (1,0; 1,5 e 2,0 mL/L) nas condições de pH 4,5 e temperatura de 60°C, por 24 horas. Amostras foram retiradas a cada 2 horas até a 8ª hora e um ponto final na 24ª hora para avaliar quantitativamente a concentração de glicose formada na hidrólise. O melhor resultado de conversão enzimática foi empregado na fermentação alcoólica, no qual foi utilizado 0,4 g/L da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por 24 horas à 30°C. De acordo com os resultados, o melhor grau de hidrólise foi encontrado com a concentração de 2,0 mL/L de amiloglicosidase, que produziu 9,60 g/L de glicose e quando aplicado à fermentação alcoólica, produziu 4,0 g/L de etanol. Em relação à concentração inicial de amido, obteve-se 77,2% de conversão na hidrólise e 82% de rendimento na produção de etanol. Desta forma, a manipueira apresenta-se como um substrato potencial para produção de etanol, produto de elevado valor agregado, sendo necessários maiores estudos para a viabilidade técnico-econômica do processo.

Palavras-chave: Mandioca, amiloglicosidase, α -amilase, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

KUPSKI, Kerolin. **Study of the enzymatic hydrolysis of manipueira starch followed by alcoholic fermentation.** Completion of course work. Federal Technological University of Paraná. Toledo, 2018.

The industrialization of cassava, generates between solid and liquid residues, the “manipueira”, a residue highly polluting due to its great organic load, that causes serious problems when thrown without treatment in water bodies. The volume of “manipueira” produced is estimated to be between 2 and 3.6 m³ per ton of manioc processed for starch production. One of the solutions to reuse the “manipueira” is as raw material for the production of ethanol. This work aimed to evaluate the best condition for the hydrolysis of the “manipueira” by the action of the enzyme amyloglucosidase that breaks the molecule of starch into smaller, fermentable sugars. Hydrolysis is necessary for alcoholic fermentation because the alcoholic yeasts do not have the capacity to act directly on the starch, for that it was necessary the action of the enzymes α -amylase and amyloglucosidase. In the development of the present work, the “manipueira” samples were submitted to physicochemical analyzes of pH, ash, moisture, reducing sugars, proteins, starch and Brix analyzes, biomass and alcohol determination. For the hydrolysis of the starch, the dosage of α -amylase (0.5 mL/L) at pH 6.5 and temperature of 90 ° C for 2 hours was maintained constant for all assays. From the first hydrolysis, three assays were performed in triplicate, where the concentration of amyloglucosidase (1.0, 1.5 and 2.0 mL/L) was varied under the conditions of pH 4.5 and temperature of 60°C, for 24 hours. Samples were taken every 2 hours until the 8th hour and a final point at the 24th hour to quantitatively evaluate the concentration of glucose formed in the hydrolysis. The best enzymatic conversion result was used in the alcoholic fermentation, in which 0.4 g/L of *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used for 24 hours at 30°C. According to the results, the best degree of hydrolysis was found with the concentration of 2.0 mL/L of amyloglucosidase, which yielded 9.60 g/L of glucose and when applied to alcoholic fermentation, produced 4.0 g/L of ethanol. In relation to the initial starch concentration, 77.2% conversion was obtained in the hydrolysis and 82% yield in the ethanol production. In this way, the “manipueira” presents itself as a potential substrate for the production of ethanol, a product of high added value, being necessary more studies for the technical-economic viability of the process.

Keywords: Cassava, amyloglucosidase, α -amylase, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AMG	Amiloglicosidase
ATP	Adenosina trifosfato
Brix	Escala numérica de índice de refração
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
g	Gramma
HCN	Ácido cianídrico
kg	Quilograma
L	Litro
m	Mili
m ³	Metros cúbicos
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídio
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Piruvato
α	Gama
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção do amido de mandioca.....	17
Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca	18
Figura 3 - Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.	21
Figura 4 – Hidrólise da manipueira à 60°C e pH 4,5. Concentração de 1,0 mL/L de amiloglicosidase. Concentração de 1,5 mL/L de amiloglicosidase. Concentração de 2,0 mL/L de amiloglicosidase.	37
Figura 5 - Gráficos do tempo versus liberação de AR. Ensaio 1 e 5: 0,49 µL/g AMG; 3,81% de substrato. Ensaio 2 e 6: 0,87 µL/g AMG, 3,81% de substrato. Ensaio 3 e 7: 0,49 µL/g AMG; 6,19% de substrato. Ensaio 4 e 8: 0,87 µL/g AMG; 6,19% de substrato. Ensaio 13 e 14: 0,68 µL/g AMG; 5,0% de substrato.....	38
Figura 6 - Variação das concentrações de biomassa, Brix, pH e etanol durante a fermentação do hidrolisado de manipueira. Temperatura de 30°C. (a) Biomassa. (b) °Brix. (c) pH e (d) Etanol.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da manipueira.....	19
Tabela 2 - Condições apresentadas como ideais para hidrólise do amido da manipueira.....	30
Tabela 3 - Condições físico-químicas para a hidrólise do amido da manipueira.....	31
Tabela 4 - Caracterização da manipueira de fecularia e comparação com outros autores	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Cultura da mandioca.....	16
2.2	Processamento da mandioca.....	17
2.3	Manipueira.....	19
2.4	Hidrólise enzimática.....	20
2.5	Fermentação alcoólica.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Procedimento experimental.....	25
3.2	Obtenção e armazenamento da amostra.....	25
3.3	Caracterização físico-química do resíduo.....	25
3.3.1	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	26
3.3.2	Cinzas.....	26
3.3.3	Umidade.....	26
3.3.4	Açúcares redutores.....	27
3.3.5	Proteínas.....	27
3.3.6	Amido.....	29
3.4	Hidrólise enzimática.....	29
3.4.1	Cálculo do rendimento e eficiência da hidrólise.....	31
3.5	Fermentação.....	32
3.5.1	Determinação de °Brix.....	32

3.5.2	Determinação da biomassa	32
3.5.3	Determinação do teor alcoólico	33
3.5.4	Cálculo do rendimento, eficiência e produtividade da fermentação	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1	Caracterização da manipueira	36
4.2	Hidrólise enzimática da manipueira	37
4.3	Fermentação alcoólica	39
5	CONCLUSÃO	44
6	SUGESTÕES	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vasta biodiversidade em todo seu território, o que faz com que se tenha uma grande variedade de resíduos agrícolas e industriais, onde o bioprocessamento é de interesse tanto econômico quanto social, mas principalmente ambiental. Portanto, é importante fomentar a demonstração das vantagens existentes no desenvolvimento de novas tecnologias para obter ganho energético a partir de recursos renováveis, produzidos cada vez mais no país (BRINGHENTI, 2004).

Uma das culturas, entre tantas, é a da mandioca, que é considerada a de mais alta produtividade e de maior eficiência biológica como fonte de energia. Difundida na maior parte do território brasileiro, sendo o estado do Paraná o segundo maior produtor, tendo como destaque a produção de amido e farinha (EMBRAPA, 2017).

A industrialização da mandioca gera uma série de resíduos cujo impacto ambiental pode ser extremamente danoso. Os principais resíduos segundo Bianchi e Cereda (1999), são os sólidos, como casca marrom, entrecasca, descarte, fibra, bagaço e varredura, e resíduos líquidos como água de lavagem e a manipueira. A manipueira líquida, o resíduo mais problemático, é resultante do processo de extração e purificação da fécula, pois possui elevada carga de poluente pela presença de carboidratos e o do ácido cianídrico. Durante o processamento da mandioca, é gerado um volume médio de 2,6 m³ de água de lavagem das raízes de mandioca e 3,6 m³ de manipueira da extração de fécula por tonelada de mandioca processada (PINTO E CABELLO, 2011).

Para reduzir os impactos ambientais causados pelos efluentes do processamento da mandioca, uma das possibilidades é destinar esses efluentes como matéria prima para produção de álcool carburante, via fermentação alcoólica, tomando como referência a cultura da cana de açúcar (BRINGHENTI, 2004).

A produção de etanol a partir de matérias primas amiláceas exige a hidrólise do amido, pois este não é fermentado pela levedura alcoólica. O amido é um polímero composto por amilose e amilopectina. A amilose é de maior predominância, composta de unidades de glicose polimerizadas por ligações glicosídicas $\alpha - 1,4$, de forma linear, e a amilopectina é um polímero de maior peso molecular, onde as unidades de glicose estão unidas por ligações $\alpha - 1,4$ e $\alpha - 1,6$ em configuração ramificada (LEONEL E CABELLO, 2001).

As enzimas capazes de quebrar as ligações glicosídicas do amido são as enzimas amilolíticas. As amilases são catalisadoras da hidrólise de ligações dos tipos $\alpha - 1,4$ e $\alpha - 1,6$, sendo classificadas como α -amilases, β -amilases, amiloglicosidases, pupulanases e isoenzimas. As α -amilases são endo-glicosidases, atuam em regiões internas do polissacarídeo afastadas da extremidade redutora, produzindo inúmeros tipos de oligossacarídeos. As amiloglicosidases são consideradas exoenzimas por atuarem nas extremidades não redutoras. A ação conjunta dessas duas enzimas sobre o amido produzirá dextrinas, pois hidrolisam as ligações glicosídicas fornecendo como produto final moléculas de D-glicose (TORRES, 2012).

Após a obtenção do hidrolisado é feita a fermentação alcoólica, pela ação da levedura, *Saccharomyces cerevisiae* que oxida os açúcares obtidos na hidrólise transformando-os em álcool.

A busca por processos que aperfeiçoem a hidrólise do amido da manipueira visando a obtenção de etanol, se torna importante para a inclusão desta cultura na nova matriz energética brasileira. Também se torna mais uma opção para o reaproveitamento do resíduo do processamento da mandioca, contribuindo para o meio ambiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a melhor condição para a hidrólise do amido da manipueira pela ação da enzima amiloglicosidase, a qual quebra a molécula do amido em açúcares menores, visando a fermentação alcoólica com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obtenção e caracterização da manipueira;
- Avaliar a melhor condição para a hidrólise do amido da manipueira variando a concentração da enzima amiloglicosidase;
- Realizar a fermentação alcoólica do hidrolisado de manipueira nas melhores condições obtidas da hidrólise, empregando-se a *Saccharomyces cerevisiae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) originária da América do Sul, constitui um dos principais alimentos energéticos para mais de 700 milhões de pessoas, com mais de 100 países produzindo mandioca, principalmente nos países em desenvolvimento. Com fácil adaptação, no Brasil, é cultivada em todos os estados brasileiros, com participação de 10% da produção mundial (segundo maior produtor do mundo). É fonte de matéria prima para inúmeros produtos industriais e importante fonte na geração de emprego e de renda (EMBRAPA, 2006).

No cenário nacional atual, o Paraná é o detentor da segunda maior produção (16,8%), atrás apenas do Pará (22,6%). Dentro do panorama paranaense, a maior produção de mandioca se concentra na região noroeste, nos núcleos regionais de Paranavaí, Campo Mourão, Umuarama e Toledo. É também nessa região que se concentram as indústrias de fécula e de farinha (DERAL/SEAB, 2015).

Segundo Christopher Azevedo (2015), o estado paranaense conta com 40 indústrias de fécula das 69 existentes no Brasil, representando 58% do parque nacional, sendo responsável por 70% da fécula produzida no Brasil, cerca de 550 mil toneladas no ano de 2015.

As raízes de mandioca são matéria prima para alguns produtos de transformação, que permitem seu uso por longo tempo como alimento ou ingredientes/aditivos para diversas aplicações. Com ela podem ser produzidos farinha, fécula ou polvilho doce, fécula fermentada ou polvilho azedo, raspas, farinhas de raspas, tapioca, flocos, álcool, acetonas, álcool butílico, etc (LIMA, 1982).

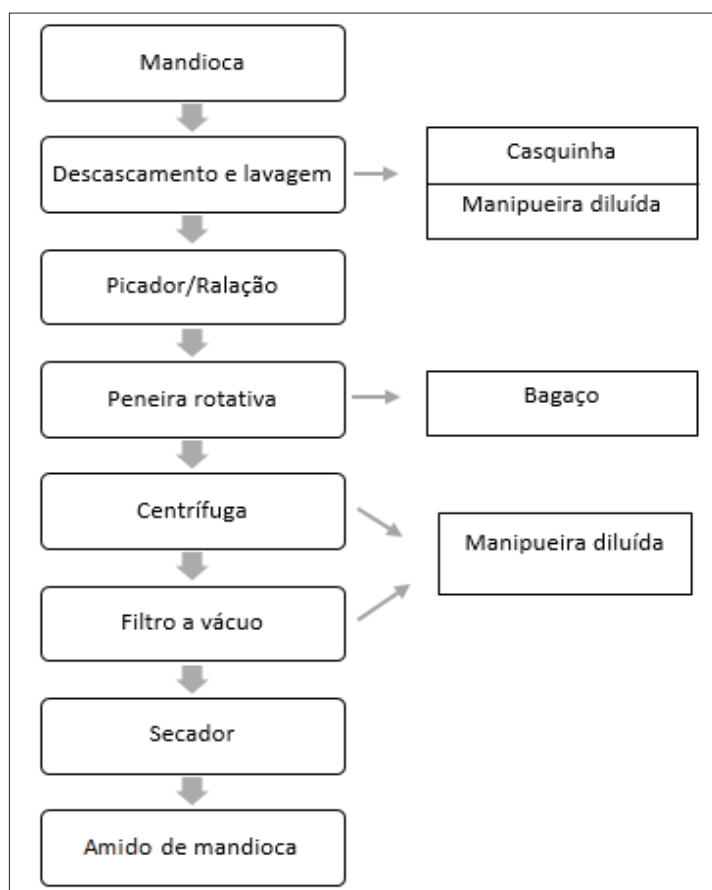
Fécula e amido são sinônimos do ponto de vista da composição química, entretanto, a legislação brasileira considera amido a substância amilácea encontrada nos órgãos aéreos vegetais e fécula a encontrada nas raízes e tubérculos (LEONEL *et al.*, 2000).

2.2 Processamento da mandioca

As indústrias de mandioca no Brasil, são conhecidas pela obtenção de produtos amiláceos, onde a mandioca pode ser transformada em farinha ou ser processada, extraindo o amido da mandioca. O processamento produz resíduos sólidos, como casca marrom, entrecasca, descarte, farelo e outros, e resíduos líquidos como a manipueira, altamente tóxica e poluente por possuir ácido cianídrico (LAMAISON, 2009).

O processo de produção do amido, esquematizado na Figura 1, consiste no recebimento das raízes, sua lavagem, descascamento, picagem e/ou ralação, peneiramento, centrifugação, filtração e secagem da massa. O bagaço é eliminado e a fécula é arrastada pela água e separada desta por decantação em tanques ou planos inclinados ou, nas indústrias mais equipadas, por centrifugação. O amido obtido é seco em secadores de túnel ou flash-dryer (LEONEL e CEREDA, 2000; BALAGOPALAN, 2002).

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção do amido de mandioca

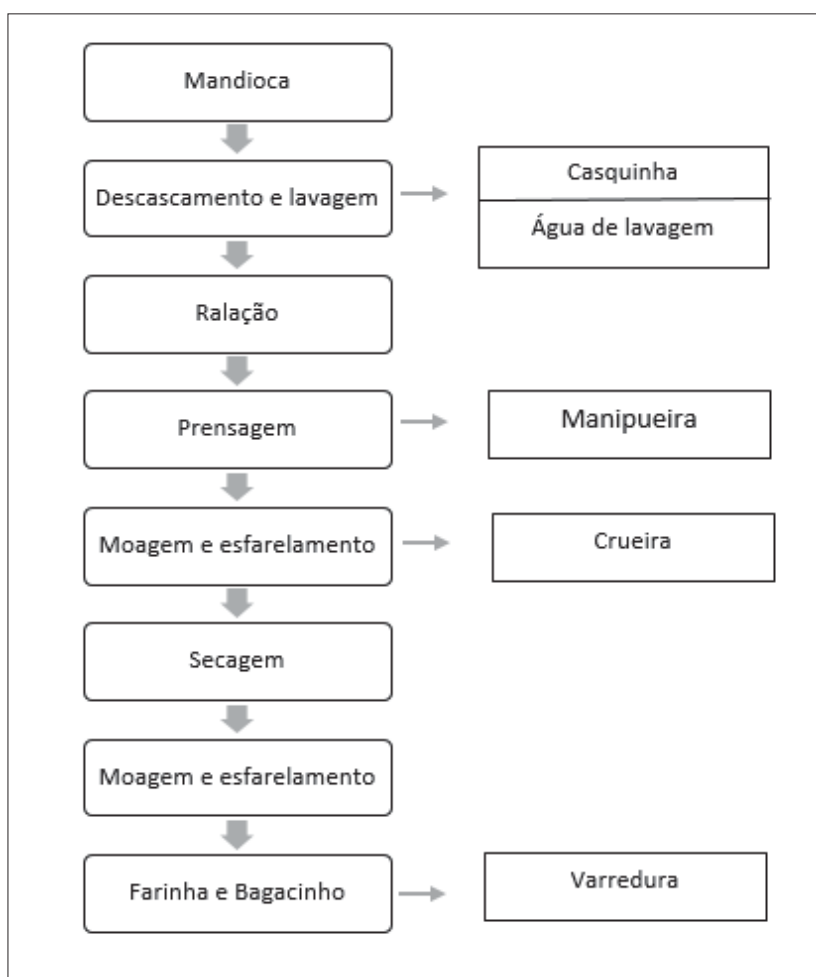


Fonte: Adaptado Pinto, 2008.

Pode-se verificar na Figura 1 que dois tipos diferentes de águas são gerados durante o processamento da mandioca até amido. A primeira água é proveniente da lavagem das raízes de mandioca, a segunda, é a manipueira ou água vegetal, água utilizada na extração e prensagem da massa ralada da mandioca na confecção do amido.

O esquema da produção da farinha de mandioca, encontra-se na Figura 2. Neste processamento a mandioca é apenas descascada, ralada, prensada, moída e seca. A água de prensa das raízes de mandioca é considerada, neste caso, a manipueira de farinha.

Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca



Fonte: Adaptado Pinto, 2008.

2.3 Manipueira

A água extraída na prensagem da massa de mandioca, a manipueira, é o principal resíduo líquido resultante do processamento da mandioca. Os volumes gerados, em média, são aproximadamente de 2,62 m³ por tonelada de raízes para água de lavagem e para a extração de fécula, esse volume de água aumenta para 3,68 m³ por tonelada de raízes (CARDOSO, 2005).

Segundo Amorim *et al.* (2016) a caracterização físico-química da manipueira é variável, dependendo da espécie cultivada, época do ano, tipo de solo, temperatura, altitude, umidade, entre outros, também da forma de processamento das raízes, e principalmente em relação à matéria orgânica e ao potencial tóxico. A composição da manipueira, segundo Cereda (2001), está descrita na Tabela 1.

Tabela 1- Composição da manipueira

Componentes	Manipueira de farinha	Manipueira de fecularia
Água (%m/v)	92,60	91,53
Proteína	1,15	0,97
Amido (% m/v)	5,42	6,12
Mat. Graxa (%m/v)	0,30	0,11
Cinzas (%m/v)	0,34	0,08
Fibras (%m/v)	0,15	0,10
pH	4,10	4,10
Acidez*	3,27	2,70
HCN (mg/L)	463,76	80,00

*mL NaOH/100g

Fonte: CEREDA, 2001.

Conforme Suman *et al.* (2011), em suas análises da manipueira de uma farinha, esta apresentava 10,5% de matéria seca, sendo 6,3% de amido e 1,96% de açúcares solúveis totais.

A manipueira também se caracteriza por conter elevada carga orgânica solúvel (DQO) e alguns sólidos insolúveis ou em suspensão, além da presença de glicosídeo hidrolisável e de cianetos, que apesar da pequena quantidade levando-se em consideração a diluição, permanece nesta água na forma de ácido cianídrico aumentando o seu potencial poluidor (CEREDA, 2001).

Na maioria das indústrias, a manipueira gerada ainda não é aproveitada como subproduto e tem como destino as lagoas de estabilização, onde sofre ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, decantação e atividade microbiana local. Nas lagoas este resíduo tende a penetrar no solo, alcançando lençóis freáticos e contaminando aquíferos, além de produzir odor desagradável, atrair insetos e degradar o ambiente ao redor (CAMILI, 2007).

Segundo Cereda (2001), há uma necessidade de reaproveitar a manipueira como alternativa na produção de biogás e álcool, devido as suas características e o grande volume gerado no processamento da mandioca.

2.4 Hidrólise enzimática

Para o aproveitamento da manipueira na produção de álcool torna-se necessário a hidrólise do amido residual uma vez que as leveduras empregadas na fermentação alcoólica não conseguem fermentar o amido diretamente.

A hidrólise do amido consiste na clivagem do polímero de amido em fragmentos de cadeia curta, como dextrina e maltose, ou glicose.

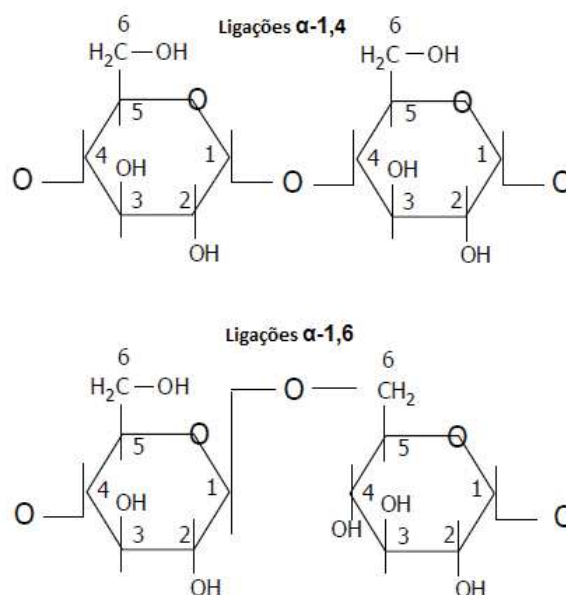
Para a hidrólise/sacarificação do material amiláceo podem ser utilizados três processos: ácido, ácido-enzimático e enzimático. O processo mais simples de hidrólise do amido é o ácido, onde uma pasta de amido recebe, geralmente, ácido clorídrico concentrado e submetida à ação do calor por um período de tempo. Porém, esse processo tem desvantagens como elevado consumo de energia, baixo rendimento, baixa seletividade e pouca flexibilidade operacional. Em função disso, os processos enzimáticos vêm ganhando destaque (URBANO, 2012).

As enzimas são substâncias sólidas difíceis de serem cristalizadas, devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e em álcool diluído e quando em soluções, são precipitados pela adição de sulfato de amônio, álcoois ou ácido tricloroacético. As enzimas aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem dentro de células vivas sem sofrer qualquer alteração geral dos agentes envolvidos. O processo biológico de hidrólise se dá pela ação das enzimas, podendo ser concentradas, purificadas e utilizadas industrialmente (SCIPIONI, 2011).

As endoenzimas, como as amilases, oriundas de plantas, bactérias, fungos e animais, agem nos grânulos do amido. A α -amilase atua degradando o amido em compostos como oligossacarídeos, dextrinas, maltose e glicose, pela hidrólise das ligações glicosídicas α -(1,4) e/ou α -(1,6), conforme mostra a Figura 3. Já as exoenzimas como a β -amilase atuam somente nas extremidades não redutoras finais e em cadeias de amilose e amilopectina, produzindo maltose (SANTANA, 2007).

A amiloglicosidase ou glicoamilase (AMG) é uma exoenzima, que libera unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras do amido, especificamente as ligações α -(1,4), como mostra a Figura 3, como também dextrinas, além da maltose, hidrolisando-as contínua e quase totalmente à D-glicose.

Figura 3 - Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.



Fonte: Eduardo, 2002.

As endo-amilase, conforme Freitas *et al.* (2014) tem o pH ótimo entre 6,0 a 7,0 e temperatura ótima entre 60°C e 90°C, dependendo dos microrganismos produtores da enzima. Já para as exo-amilase o pH ótimo é de 4,0 a 5,0 e temperatura de 60°C. A ação destas enzimas sobre o amido resulta ao final em moléculas de maltose, moléculas de dextrinas-limite (com 3 a 4 resíduos de glicose) e ocasionalmente glicose.

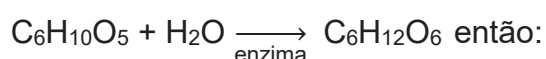
A hidrólise é normalmente realizada em duas etapas, sendo a primeira chamada de liquefação e a segunda de sacarificação. A etapa de liquefação ou

dextrinização se dá com a ação da enzima α -amilase provocando mudanças nas características físicas e químicas. Como resultado se tem a transformação do amido em dextrina, com uma queda acentuada da viscosidade da pasta de amido gelatinizada (SILVA *et al*, 2006).

O amido liquefeito, constituído em sua maioria por oligossacarídeos, é transformado em hidrolisados contendo principalmente açúcares de baixo peso molecular. A sacarificação é realizada com ajuda de enzimas específicas, como a AMG, onde as dextrinas são convertidas em carboidratos de pequeno peso molecular, incorporadas pelas leveduras durante o processo de fermentação (CAMILI, 2007).

Para definir os valores de amido que se transforma em glicose, assume-se que quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre a incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio. Estequiometricamente, cada mol de glicose produzida incorpora um mol de água.

Considerando que:



162,16g de amido + 18g de água = 180,16g de glicose ou
100 g de amido teoricamente produz 111,1g glicose.

Segundo Cerqueira (2012), um hidrolisado com alto teor de glicose apresenta concentração de glicose de 94% em peso e dextrose equivalente de 96,28%, pode-se então calcular a concentração máxima de conversão a partir do amido. A dextrose equivalente (D.E) é uma estimativa do grau de hidrólise do substrato amiláceo, ou seja, um hidrolisado com 100 D.E possui 100% de glicose.

Urbano *et al.* (2009) reportam sobre o rendimento do processo de produção de etanol a partir de manipueira onde obtiveram o perfil de açúcares no hidrolisado, mostrando a presença de 2,13% de glicose, 2,88% de maltose, 3,09% de frutose e 0,2% de sacarose. Pelo balanço de massa do processo, considerando a massa inicial de 15 kg de manipueira, o rendimento teórico do processo de hidrólise calculado foi de 1,344 kg de açúcares fermentescíveis. O resultado final mostrou um total de 1,245 kg de açúcares fermentescíveis, ou seja, um rendimento de hidrólise de 92,63%.

Em um trabalho realizado por Camili *et al.* (2009), que teve como objetivo avaliar o aproveitamento da manipueira desidratada através dos processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica para produção de etanol, foram obtidas em análises cromatográficas, de alíquotas de manipueira hidrolisada, os valores de

12,20 g/L de frutose, 204,94 g/L de glicose, 10,93 g/L de sacarose e 1,85 g/L de maltriose. Os valores obtidos demonstraram que o processo de hidrólise obteve valores superiores a 100% em relação ao rendimento de glicose, devido a presença de amidos fragmentados como dextrinas e outras substâncias sensíveis a ação das enzimas amilolíticas utilizadas no processo.

2.5 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica ocorre no interior de microrganismos capazes de converter açúcares assimiláveis (substrato oxidado) em etanol (substrato reduzido), por meio de uma série de reações bioquímicas reguladas enzimaticamente. A oxidação parcial do substrato, gerando um composto orgânico reduzido, garante um mínimo de produção de energia para manutenção celular e o equilíbrio oxidativo (CINELLI, 2012).

A glicose, quando fermentada pelos microrganismos, é convertida por uma série de reações chegando em piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo de dois passos. No primeiro, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível, catalisada pelo piruvato descarboxilase. Esta reação é uma descarboxilação simples e não envolve oxidação do piruvato. No segundo passo, através da ação do álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com a NADH, fornecendo poder redutor (NELSON e COX, 2011). A fermentação alcoólica é quimicamente representada pela Equação 1:



Na produção industrial de álcool e aguardentes, o micro-organismo mais usado no processo de fermentação é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nas grandes indústrias produtoras de etanol são usadas leveduras de panificação, prensadas e secas ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001).

Sendo as leveduras microrganismos mesófilos, em geral, as temperaturas ótimas para sua utilização em processos industriais irão se situar na faixa entre 25 e 35°C. Para a produção de etanol, a temperatura ótima obtida é de 30°C (CABRAL *et al.*, 2006).

Segundo Schmidell *et al.* (2001), os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes do mosto é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo.

No trabalho apresentado por Urbano *et al.* (2009) após a hidrólise da manipueira, ao hidrolisado foi adicionado o fermento comercial *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 3% (p/v), onde o processo foi realizado em Erlenmeyer de 4L, colocado em incubadora refrigerada com agitação de 100rpm, temperatura de 19°C, por 20h. A análise do mosto em HPLC mostrou a presença de 612g de etanol, portanto o rendimento do processo de fermentação foi de 96,18%.

Camili *et al.* (2009) em seu trabalho, após o processo de hidrólise do amido desidratado, utilizou um volume de 4L de hidrolisado, o qual foi diluído a 16° Brix, e inoculado com 4% (p/v) de levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 10hs a 30°C. Ao final da fermentação o vinho fermentado foi centrifugado e analisado quanto a concentração de etanol produzido por cromatografia líquida, obtendo 57,25 g/L de etanol, ou seja, um rendimento de 28%.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi realizado nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Toledo (UTFPR), utilizando a manipueira coletada em uma feclaria da região oeste do Paraná.

3.2 Obtenção e armazenamento da amostra

A manipueira foi coletada, com um volume total de 20 litros, diretamente na saída das centrífugas de amido de mandioca na área de produção da empresa de feclaria, no dia 19 de abril de 2018.

As amostras foram acondicionadas em embalagens de 5 litros, as quais foram homogeneizadas e congeladas em freezer a $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A metodologia descrita na ISO 6887-2 foi utilizada para descongelamento do produto evitando assim alterações nas propriedades físico-químicas, garantindo a confiabilidade dos testes realizados. A manipueira foi transferida para geladeira 24 horas antes da sua utilização, mantendo-se refrigeração à temperatura de $3,0^{\circ}\text{C} + 2,0^{\circ}\text{C}$.

3.3 Caracterização físico-química do resíduo

As análises físico-químicas foram realizadas para determinar o pH, as cinzas, a umidade, os açúcares redutores, a proteína e o amido, de acordo com o AOAC (1975), Instituto Adolfo Lutz (2008), Miller (1959), e Carvalho; Fernando & Pires (2006).

3.3.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado por pHmetro digital, através do método descrito pela AOAC (1975), onde a leitura é feita diretamente no monitor do equipamento.

3.3.2 Cinzas

O teor de cinzas é o resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura entre 550 a 570°C obtido por ignição de quantidade conhecida da amostra. Pesou-se em torno de 3,0 g de amostra em um cadinho previamente aquecido em mufla a 550° e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente. A amostra foi levada à mufla até que as cinzas ficassem brancas ou ligeiramente acinzentadas, sendo em seguida resfriado em dessecador. O teor de cinzas foi obtido pesando-se o cadinho com a amostra e descontando-se o peso do mesmo para obtenção do teor de resíduo mineral gerando o valor N conforme mostra a Equação 2 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$Cinzas (\%) = \left(\frac{N}{P}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

N = número de gramas de cinzas

P = número de gramas de amostra

3.3.3 Umidade

Para determinar a umidade, pesou-se cerca de 3,0 g de amostra em cadinho de porcelana, previamente seco em estufa, sendo levada a estufa a 105°C até peso

constante. Os resultados foram expressos em % de umidade de acordo com a Equação 3 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$Umidade (\%) = \left(\frac{N}{P}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

U = porcentagem de umidade

N = número de gramas de umidade (perda de massa)

P = número de gramas da amostra inicial

3.3.4 Açúcares redutores

O método colorimétrico do 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) foi empregado, descrito segundo Miller (1959). Utilizou-se na análise 1,0 mL de amostra e 1,0 mL de reagente DNS, diluindo com água destilada até o volume de 10 mL, levado ao aquecimento e posterior análise da absorvidade de composto formado no espectrofotômetro marca Spectroquant Merck modelo Pharo 100 em 540nm.

3.3.5 Proteínas

A determinação de proteína bruta foi realizada através do Método de Kjeldahl, que é compreendida em três etapas. A primeira etapa é a digestão da amostra em H₂SO₄, a segunda etapa é a liberação de amônia pela adição de NaOH e a terceira é a titulação da amônia com ácido (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Na digestão ocorre o aquecimento da amostra, com a presença de um catalisador, com ácido sulfúrico concentrado que causa a oxidação do carbono e hidrogênio. Onde o carbono é transformado em dióxido de carbono (CO₂), o hidrogênio em água (H₂O) e o nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio (LANAGRO, 2013).

O objetivo da etapa de destilação é transformar o nitrogênio presente na solução, que está na forma de sulfato de amônio (NH_4^+), para NH_3 gasoso. Com adição de NaOH concentrado e aquecimento ocorre a liberação da amônia que é separada da mistura por destilação, então, o gás reage com uma solução de ácido bórico, formando o borato de amônio. A etapa final consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico ou clorídrico padronizada (LANAGRO, 2013).

Para a realização da determinação das proteínas, uma quantidade de 2 g de manipueira foi pesada em tubo de destilação de Kjeldahl, adicionando 2,5 g de mistura catalítica e 25 mL de ácido sulfúrico. O tubo foi levado para bloco digestor elevando a temperatura gradativamente até uma temperatura final de 450°C , após esse tempo o líquido tornou-se límpido e transparente de tonalidade azul esverdeada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O tubo de Kjeldahl foi acoplado no início de um destilador de nitrogênio da marca TECNAL – TE-0364, e na extremidade final um erlenmeyer com cerca de 20 mL de solução de ácido bórico com 5 gotas de indicador misto. Adicionou-se hidróxido de sódio a 30% (p/v) ao tubo até garantir um ligeiro excesso de base e iniciada a destilação até atingir um volume de aproximadamente 75 mL no erlenmeyer. A solução foi levada para titulação com ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador (coloração verde à leve tom róseo - avermelhado).

A porcentagem de proteínas foi determinada através da Equação 4.

$$\% \text{ Nitrogênio Total} = \frac{(V \cdot N \cdot 0,014 \cdot 100)}{m} \quad (4)$$

Onde,

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto na titulação após a correção do branco (mL);

N = normalidade teórica da solução de ácido sulfúrico 0,1 N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

m = massa da amostra (g).

3.3.6 Amido

Conforme Carvalho; Fernandes & Pires (2006), o amido não apresenta reação redutora. Uma hidrólise energética em meio fortemente ácido produz exclusivamente glicose, que é determinada pelo método de Lane-Eynon. Baseia-se na redução de um volume conhecido de um reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que é reduzido à sua forma leuco por um pequeno excesso de açúcar redutor.

Para determinação de glicose no hidrolisado, uma quantidade de 10 g de amostra foi pesada, transferiu-se para um Erlenmeyer com 50mL de HCl 1M. Os frascos contendo a amostra foram colocados em micro-ondas por 20 min na potência máxima. Em seguida as amostras foram neutralizadas com a solução de NaOH 40% (p/v) usando três gotas de fenolftaleína até que a solução ficasse com coloração rosa.

Após esse processo, foram preparados os frascos com o licor de Fehling, adicionando em um balão 10 mL de cada uma das soluções de Fehling e algumas pérolas de ebulição, com 40 mL de água destilada, sendo aquecido até a ebulição. Adicionou-se gota a gota da solução da bureta até que ficasse levemente azulada. A ebulição foi mantida para adicionar uma gota da solução de azul de metileno a 1 %, continuando a titulação até a descoloração do indicador.

A porcentagem de amido foi calculada pela Equação 5 sendo empregada a conversão para amido multiplicando-se pelo fator 0,9, segundo descrito por Leonel e Cereda (1998).

$$\% \text{ Amido} = \frac{(FC/2) \cdot 250 \cdot 100 \cdot 0,9}{V \cdot P} \quad (5)$$

Onde:

FC = título da solução Fehling;

V = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação;

P = peso da amostra em g.

3.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise da manipueira ocorreu por adição das enzimas α -amilase TERMAMYL 120 L produzida pela Novozymes e amilglicosidase AMG 300 L marca

Sigma-Aldrich. Esta hidrólise enzimática foi realizada em batelada, em condições de temperatura controlada, processadas em banho maria no agitador magnético EVEN HJ-5 e em shaker de bancada Weg CFW08, modelo Maqib-shaker, com Erlenmeyer de 250 mL e agitação constante das amostras a 200 rpm.

A operação de hidrólise do amido da manipueira foi estudada a partir das melhores condições encontradas e ou referenciadas por autores citados na presente pesquisa, apresentados na Tabela 2.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 2 e após uma análise do processo através da revisão bibliográfica, foi fixada a concentração de 0,5 mL/L para o processo de liquefação com a α -amilase, a temperatura de 90°C e pH 6,5. Nas amostras adicionou-se hidróxido de sódio 4,0M para a correção do pH desejado. O processo se deu em banho maria no agitador magnético em temperatura de 90°C por um período de 2 horas.

Tabela 2 - Condições apresentadas como ideais para hidrólise do amido da manipueira

	Camili et al (2009)	Urbano et al (2009)	Tiezzi (2015)
Liquefação			
Concentração de α -amilase	Não cita	0,5 mL/L	0,55 mL/ 0,45L
Temperatura	90°C	90-95°C	92°C
pH	6,0 – 7,0	6,28	6,33
Tempo	2h	2h	2h
Sacarificação			
Concentração de amiloglicosidase	Não cita	1,13 mL/L	0,85 mL/ 0,45 L
Temperatura	65°C	60°C	60°C
pH	4,0 – 4,5	4,5	4,5
Tempo	16h	24h	12h
% Hidrólise	Não cita	92,63%	Não cita

Fonte: Camili *et al* (2009); Urbano *et al* (2009) e Tiezzi (2015).

Para o processo de sacarificação foram testadas as combinações apresentadas na Tabela 3, para verificar qual o melhor rendimento na conversão do amido para glicose. Foram utilizadas três diferentes concentrações de amiloglicosidase: 1,0 mL/L, 1,5 mL/L e 2,0 mL/L; temperatura de 60°C e pH 4,5. O pH foi corrigido até o valor desejado usando ácido clorídrico 1,0M.

O tempo decorrido para a sacarificação com amiloglicosidase foi de 24 horas, mantendo-se a temperatura em 60°C e agitação de 200 rpm em shaker de bancada.

No decorrer dos experimentos foram retiradas alíquotas de amostra, aproximadamente 30 mL, a cada 8 horas durante o processo de hidrólise, para posterior análise de açúcar redutor.

Tabela 3 - Condições físico-químicas para a hidrólise do amido da manipueira

pH	Temperatura	Concentração de α -amilase	pH	Temperatura	Concentração de amiloglicosidase
6,5	90°C	0,5 mL/L	4,5	60°C	1,0 mL/L
6,5	90°C	0,5 mL/L	4,5	60°C	1,5 mL/L
6,5	90°C	0,5 mL/L	4,5	60°C	2,0 mL/L

Fonte: Autoria própria

3.4.1 Cálculo do rendimento e eficiência da hidrólise

A eficiência do processo foi calculada sobre a quantidade de amido na matéria prima que iniciou no processo. O rendimento teórico da hidrólise ($Y_{teórico}$) do amido é obtido pela fórmula (Equação 6) descrita por Santana (2007).

$$Y_{teórico} (g/g) = 180/162 = 1,11 \quad (6)$$

E conforme a Equação 7 a seguir o valor de 180 é a massa molecular da glicose e 162 é a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido.



A partir dos valores teóricos é calculada a eficiência da hidrólise pela Equação 8, sendo que o valor de Y_{real} é o rendimento de açúcares obtido na suspensão do ensaio (g/L), $Y_{teórico}$ é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L). O resultado é expresso em %.

$$Eficiência da hidrólise (\%) = \frac{Y_{Real}}{Y_{Teórico}} \cdot 100 \quad (8)$$

3.5 Fermentação

A metodologia foi utilizada conforme Andrade (2005), para a fermentação alcoólica da manipueira usando as melhores condições no item 3.4, em que foram utilizados 0,4 g/L da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente do fermento biológico fresco da marca Fleischman, foi reativada a agitação constante à 50 rpm por 2 horas. A fermentação foi realizada em escala de laboratório em Erlenmeyer de 500 mL, providos de válvula Airlock tipo S para liberação de CO₂.

Durante a fermentação alcoólica, inicialmente amostras de 100 mL foram coletadas a cada 2 horas até a 8ª hora e um ponto final após 24 horas de fermentação. As amostras foram então filtradas, onde o resíduo retido no papel filtro marca Qualy (0,45 micras) foi a biomassa produzida, sendo o filtrado utilizado para a determinação do teor alcoólico.

3.5.1 Determinação de °Brix

A determinação de °Brix foi realizada através do método de refração, que representa os sólidos dissolvidos na amostra, utilizando o refratômetro de bancada (modelo ABBE 0-95%).

3.5.2 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi realizada conforme a metodologia da biomassa seca proposta no trabalho desenvolvido por Albiero (2013). O papel filtro previamente pesado, junto da biomassa retida na filtração, foram levados a uma estufa a 105°C por 24 horas, em que se obteve a massa seca para 100 mL através da Equação 9:

$$[BIOMASSA = (Massa_{amostra+papel\ filtro} - Massa_{papel\ filtro})] \quad (9)$$

Onde:

BIOMASSA= conteúdo seco presente na amostra;

Massa amostra+papel filtro= massa do filtrado + papel filtro;

Massa papel filtro= massa do papel filtro previamente pesado.

3.5.3 Determinação do teor alcoólico

As alíquotas de amostra coletadas durante a fermentação foram filtradas, onde a biomassa ficou retida no papel filtro e o filtrado foi utilizado para a determinação do teor alcoólico.

Na determinação do teor alcoólico das amostras retiradas do fermentado utilizou-se a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) de determinação de álcool em volume a 20°C utilizando o micro destilador de álcool marca Tecnal modelo TE-012.

O procedimento para esta análise foi realizado em duplicata e com um volume de 40 mL de cada amostra para a destilação, sendo as alíquotas adicionadas ao micro destilador e o destilado (solução hidro alcoólica) coletado em sua extremidade até um volume aproximado de 50 mL em um balão volumétrico de 100 mL e adicionada água destilada para ajuste do volume total.

Ajustou-se a temperatura em banho de gelo até atingir 20°C e transferiu-se a solução para um picnômetro de 50 mL previamente calibrado e seco e anotada a sua massa.

Com o resultado do volume real que foi obtido da calibração do picnômetro e a massa do hidro alcoólico foi possível determinar a densidade da solução com a Equação 10.

$$\rho = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (10)$$

Onde:

ρ = densidade da solução (g.cm⁻³);

m_1 = massa do picnômetro (g);

m_2 = massa do hidro alcoólico + massa picnômetro (g);

V = volume da solução (cm⁻³).

Através da densidade encontrada na equação acima para um volume de 100 mL, foi possível verificar a densidade correspondente a alíquota inicial de 40 mL, e assim encontrar o valor do teor alcoólico para cada alíquota destilada, através de um cálculo utilizando a Equação 11:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2 \quad (11)$$

Onde:

C_1 = teor alcoólico na amostra;

V_1 = volume de amostra utilizada (40 mL);

C_2 = teor de álcool encontrado na literatura Adolfo Lutz;

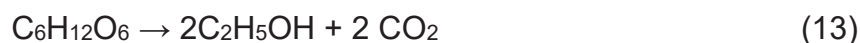
V_2 = volume total utilizado (100 mL).

3.5.4 Cálculo do rendimento, eficiência e produtividade da fermentação

Segundo Santana (2007), com o objetivo de avaliar a eficiência da fermentação, foi calculado o rendimento teórico ($Y_{p/s \text{ Teórico}}$) e comparado com o rendimento obtido ($Y_{p/s \text{ Real}}$), conforme mostrado na Equação 12:

$$Y_{p/s \text{ Teórico}} (g/g) = 92/180 = 0,511 \quad (12)$$

Os valores de 92 é a massa molecular de duas moléculas de etanol produzidas a partir da fermentação alcoólica de uma molécula de glicose e 180 é a massa molecular da glicose, conforme a Equação 13:



A eficiência é considerada como o valor percentual em relação ao rendimento teórico que se conseguiu obter em uma fermentação. O cálculo está mostrado na Equação 14 abaixo:

$$Eficiência da fermentação = \frac{Y_{p/s \text{ Real}}}{Y_{p/s \text{ Teórico}}} \cdot 100 \quad (14)$$

A produtividade da fermentação pode ser calculada pela Equação 15 a seguir:

$$Produtividade = \frac{(Etanol\ produzido)}{(Tempo\ de\ fermentação) \cdot (Volume)} \quad (15)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização da manipueira

Os resultados da caracterização da manipueira foram realizadas em triplicata sendo que a média aritmética e o coeficiente de variação são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização da manipueira de fecularia e comparação com outros autores

Análise	Resultados	CEREDA (2001) Fecularia	CAMILI (2007) Farinheira	SILVA (2015) Farinheira
pH	5,93 ± 0,05	4,10	5,91	5,26
Umidade (%)	91,78 ± 0,01	91,53	94,31	92,38
Cinzas (%)	0,10 ± 0,02	0,08	0,73	0,53
Proteína (%)	0,23 ± 0,08	0,97	1,19	1,17
Amido (%)	7,57 ± 0,25	6,12	1,17	5,1

Fonte: Cereda, 2001; Camili, 2007 e Silva, 2015.

Pela Tabela 4 verifica-se que a composição da manipueira empregada no presente trabalho consiste em 91,78% de umidade, em 0,10% de cinzas, proteína 0,23% e um teor de amido de 7,57%.

Devido às poucas referências sobre a caracterização físico química da manipueira proveniente de fecularia, a fim de comparação para os resultados obtidos no presente trabalho, os mesmos foram comparados com a manipueira de farinha.

A composição química da manipueira é variável, dependendo da variedade da mandioca utilizada, que por sua vez está correlacionada com as condições climáticas e do solo da região onde é cultivada, o manejo adotado no cultivo. O teor de amido também depende do processamento industrial, se oriunda de fecularias ou de casa de farinha, onde a etapa de filtragem do amido influencia na composição final do resíduo gerado (PINTO, 2008).

Comparando as características da manipueira utilizada para a presente pesquisa, conforme a Tabela 4, com os resultados obtidos por Cereda (2001), Camili (2007) e Silva (2015), é possível perceber uma diferença significativa no teor de

proteína de 0,23% com os valores de 0,97%, 1,19% e 1,17% respectivamente. Embora os teores de amido, excluindo o valor de 1,17 encontrado por Camili (2007), estejam com valores próximos.

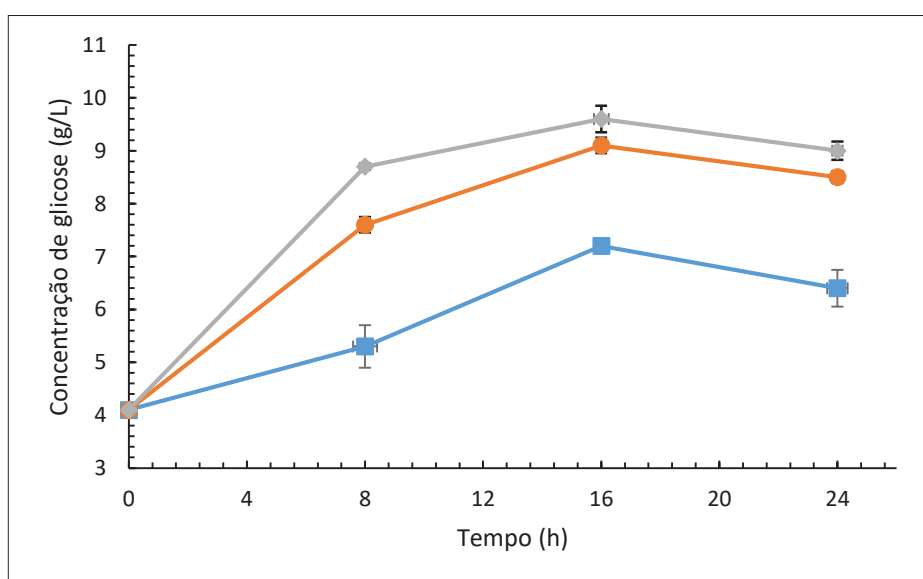
Ainda na Tabela 4, verificou-se o pH 5,93, que representa a acidez da manípueira, é um pH abaixo do ideal para o início da hidrólise, conforme determinado pelo fabricante da enzima α -amilase, sendo assim, necessária apenas uma correção do pH com hidróxido de sódio para aumentar até um valor de pH 6,50.

A caracterização permitiu conhecer de forma detalhada a manípueira de mandioca, que teve a hidrólise realizada variando a concentração de amiloglicosidase e identificou-se a condição que atinge a melhor conversão do amido em glicose, para posterior fermentação alcoólica.

4.2 Hidrólise enzimática da manípueira

Na Figura 4, estão representadas as concentrações de glicose durante a hidrólise da manípueira, na temperatura de 60°C e pH de 4,5 e concentrações da enzima amiloglicosidase de 1,0 mL/L, 1,5 mL/L e 2,0 mL/L durante as 24 horas, dadas as condições conforme a Tabela 3 item 3.4.

Figura 4 – Hidrólise da manípueira à 60°C e pH 4,5. (■) Concentração de 1,0 mL/L de amiloglicosidase. (●) Concentração de 1,5 mL/L de amiloglicosidase. (◆) Concentração de 2,0 mL/L de amiloglicosidase.



Fonte: Autoria própria

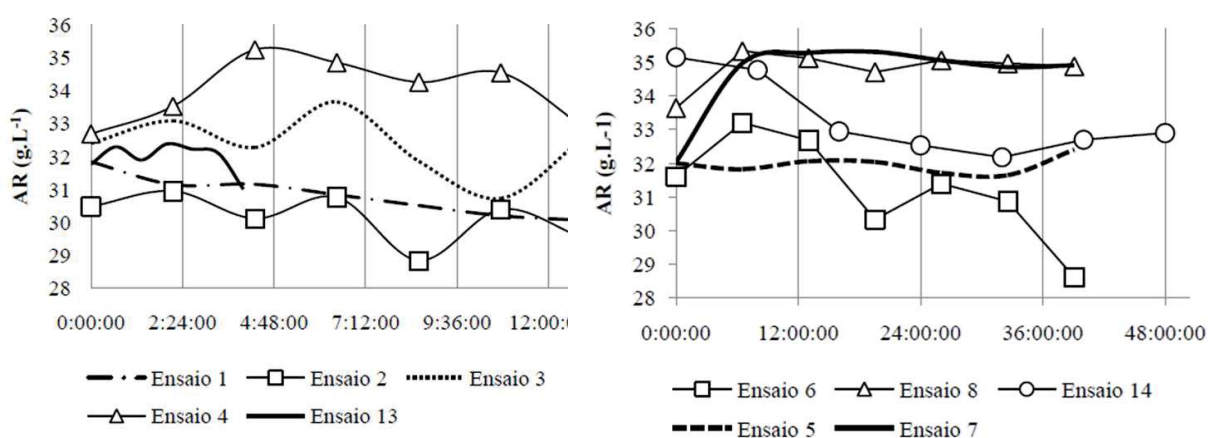
Conforme a Figura 4, a melhor conversão ocorreu com a concentração de 2,0 mL/L de amiloglicosidase no período de 16 horas, que foi maior à conversão das reações com menores concentrações de amiloglicosidase, tendo o resultado de 9,6 g/L de glicose.

Na Figura 4, nota-se que após 8 horas decorridas de hidrólise, a concentração de glicose, inicialmente com 4,10 g/L, aumenta para 5,30 g/L usando 1,0 mL/L da enzima, para 7,60 g/L de glicose com a concentração de 1,5 mL/L da enzima e 8,70 g/L de glicose usando 2,0 mL/L da enzima amiloglicosidase. Após 16 horas, as concentrações de glicose aumentam para 7,20, 9,10 e 9,60 g/L nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mL/L de enzima, respectivamente.

É pertinente observar que houve um decréscimo das concentrações de glicose, após 24 horas, a qual diminuem a 6,40, 8,50 e 9,00 g/L nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mL/L de amiloglicosidase, conforme a Figura 4.

Scipioni (2011), avaliou a hidrólise de amido de batata usando diferentes concentrações de enzima amiloglicosidase e substrato, a temperatura de 60°C. É possível observar, através da Figura 5, nos ensaios 5 e 7 com concentração de 0,49 µL/g de amiloglicosidase e o ensaio 14 com 0,68 µL/g de amiloglicosidase, que após 16 horas de hidrólise houve um decréscimo na concentração de açúcares redutores. Esse comportamento pôde também ser observado no presente trabalho, em que a concentração de glicose diminui gradativamente após a 16ª hora.

Figura 5 - Gráficos do tempo versus liberação de AR. Ensaio 1 e 5: 0,49 µL/g AMG; 3,81% de substrato. Ensaio 2 e 6: 0,87 µL/g AMG, 3,81% de substrato. Ensaio 3 e 7: 0,49 µL/g AMG; 6,19% de substrato. Ensaio 4 e 8: 0,87 µL/g AMG; 6,19% de substrato. Ensaio 13 e 14: 0,68 µL/g AMG;



Fonte: Scipioni, 2011.

Esse fato se explica, conforme Aehle (2007), que no início da sacarificação, a alta concentração do polissacarídeo induz a catalise da enzima em taxa crescente e o decréscimo desta velocidade reside na inibição exercida por quantidades crescentes de glicose, tem lugar o efeito inibitório, também chamado “efeito glicose”, que consiste na repressão da síntese de glicose.

O processo de hidrólise, que iniciou com uma concentração de 11,20 g/L de amido na manipueira, após a hidrólise, obteve-se 9,60 g/L de açúcares redutores. Essa foi a maior conversão obtida, com 2,0 mL/L de enzima e 16 horas de sacarificação. Portanto a eficiência da hidrólise foi de 77,2% em relação ao rendimento de glicose.

Urbano et al (2009), avaliaram o rendimento do processo de produção de etanol a partir de manipueira nas mesmas condições que o presente trabalho, onde iniciaram o processo com 15L de manipueira e o rendimento teórico do processo de hidrólise era de 1344g de açúcares fermentescíveis. Após a análise do hidrolisado, essa mostrou um total de 1245g de açúcares, portanto um rendimento de hidrólise de 92,63%, um rendimento maior do que o obtido no presente estudo, de 77,2%.

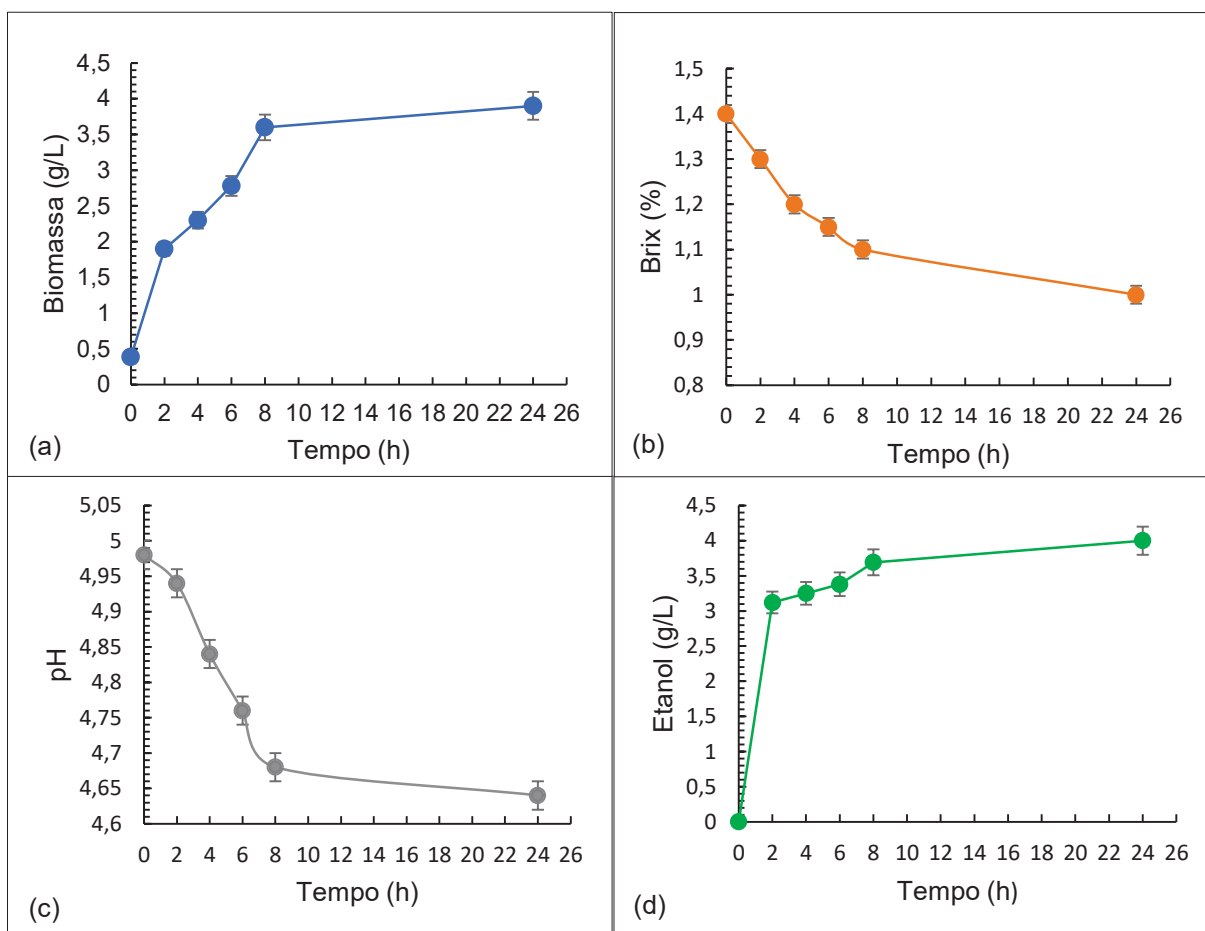
Collares (2011), estudou a otimização do processo de hidrólise da mandioca com o uso de enzimas amilolíticas, usando diferentes concentrações de substrato, contendo 11 e 12% (p/v) de amido e adicionou diferentes concentrações da enzima amiloglicosidase, obtendo resultados que variam de 60 a 100% de eficiência na hidrólise, sendo que no presente trabalho, em condições semelhantes, a hidrólise obteve 77,2% de rendimento, o que indica que a eficiência do processo de hidrólise varia de acordo com as condições de temperatura, tempo e concentrações de substrato e enzimas usadas no processo.

4.3 Fermentação alcoólica

Após a realização da escolha da melhor condição de hidrólise obtida, que foi de 2,0 mL/L de amiloglicosidase por 16 horas, o hidrolisado obtido foi empregado como meio de fermentação para a obtenção de etanol.

A Figura 6 mostra a evolução dos parâmetros como a produção de etanol, pH, biomassa e do consumo de açúcares através de grau Brix ao longo do ensaio.

Figura 6 - Variação das concentrações de biomassa, Brix, pH e etanol durante a fermentação do hidrolisado de manipueira. Temperatura de 30°C. (a) Biomassa (●); (b) °Brix (●); (c) pH (●) e (d) Etanol (●).



Fonte: Autoria própria

Pela Figura 6 (a) verifica-se que houve um crescimento celular durante a fermentação, iniciando com 0,388 g/L e obtendo até o final da fermentação 3,950 g/L. A produção de biomassa a partir da 8ª hora de fermentação até a 24ª hora, teve um pequeno crescimento de 0,31 g/L, iniciando uma fase de desaceleração devido ao esgotamento de um ou mais componentes no meio de cultura necessários são crescimento, também devido ao acúmulo de metabólitos e ou inibidores de crescimento celular (SCHMIDELL *et al.* 2001).

Observa-se (Figura 6 (a)) que não houve fase *lag*. A fase *lag* se segue imediatamente após a inoculação do meio com o micro-organismo, é o período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo, ou seja, não há reprodução celular durante essa fase. A fase *log* ou exponencial é o período de crescimento em estado estacionário, durante o qual a velocidade de

crescimento específica é constante e máxima. O crescimento celular depende de fatores como temperatura, pH, componentes do meio de cultura e disponibilidade de oxigênio para a célula. A fase estacionária ocorre quando todas as células pararam de dividir ou quando todas as células viáveis alcançaram equilíbrio com células mortas, mas ainda há metabolismo e acúmulo de produto no meio. A fase de declínio, o valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas (SCHMIDELL *et al.* 2001).

O crescimento da massa celular pode ser observado na fermentação de amido decantado de mandioca, no qual iniciou o processo com a concentração de 20 g/L de levedura e após 24 horas a massa celular apresentava 42,70 g/L de concentração, no qual Bringhenti (2004) observou o crescimento celular já nas primeiras 2 horas de fermentação, ou seja, a fase *lag* foi discreta, fato que indica que houve uma boa adaptação da levedura ao meio de fermentação.

Na Figura 6 (b) é possível observar o consumo de açúcares através da redução de grau Brix, que inicialmente era de 1,40° Brix, na 2ª hora era de 1,30° Brix, na 4ª resultou em 1,20° Brix e conforme havia formação de etanol este foi baixando e na 6ª hora o valor foi de 1,15° Brix. Até que na 8ª hora é possível verificar que a fermentação havia praticamente estabilizado (24ª hora), a produção de etanol teve um pequeno aumento e a redução dos sólidos solúveis foi de 1,10° para 1,00° Brix. O grau Brix é uma escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis em uma solução de sacarose, portanto, um grau Brix (1°Bx) é igual a 1g de açúcar por 100 g de solução (MORAES, 2006). Na obtenção de etanol pela fermentação do hidrolisado de manipueira, Tiezzi (2015) observou a redução de grau Brix de 6,3° para 5,4° Brix ao final do processo, indicando que houve o consumo de açúcares para formação do etanol.

O pH (Figura 6 (c)) foi monitorado durante a fermentação e verifica-se que houve uma redução, de 4,98 para 4,64 até o final da fermentação. O pH ótimo para a produção de etanol situa-se entre 4 e 5, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SCHMIDELL *et al.* 2001). O estabelecimento e controle do pH do meio em valores inferiores a 4 é considerado importante como meio para prevenir a contaminação por bactérias lácticas e acéticas. A redução do pH do meio a ser fermentado, após a adição do inóculo, deve-se aos produtos secundários (ácido láctico, cítrico e succínico),

produzidos durante o crescimento celular e multiplicação das leveduras, conforme menciona Hashizume (2001) em seus estudos.

Essa redução do pH durante o processo de fermentação também pôde ser observada por Santos (2013), no qual realizou a fermentação do hidrolisado de farinha de mandioca, que inicialmente apresentava pH 4,0 e após 30 horas o pH era 3,5, aproximadamente. Fato este também observado na fermentação de amido de mandioca, reportado por Santana (2007), o qual observou a queda do pH, inicialmente em 5,0 e após 24 horas de fermentação atingiu valor médio de 4,20.

Pela Figura 6 (d) observa-se que a produção de etanol é um metabólito primário, associado ao crescimento celular, e ao término da fermentação obteve-se 4,00 g/L de etanol. Suman *et al.* (2011) e Tiezzi (2015) também utilizaram a manipueira como substrato, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar o hidrolisado de manipueira, utilizando 0,400 g/L e 0,675 g/L da levedura e temperatura de 32°C e 30°C, e foram obtidos um teor alcoólico de 4,02 g/L e 5,0 g/L de etanol, respectivamente, teores próximos ao obtido no presente trabalho.

O rendimento da conversão de substrato para etanol foi determinado aplicando a Equação 14 do item 3.5, sendo que inicialmente havia 9,6 g/L de açúcares e ao final da fermentação apresentava um teor alcoólico de 4,00 g/L, desta forma o rendimento foi de 82% na produção de etanol a partir da manipueira e a produtividade foi de 0,16 g/ L.h.

Os autores citados anteriormente, Suman *et al.* (2011) e Tiezzi (2015), obtiveram produtividades de 0,17 g/L.h e 0,20 g/L.h, respectivamente, indicando que a produtividade obtida no presente trabalho (0,16 g/ L.h) está conforme com o obtido pelos autores, associado a concentração de etanol obtida em 24 horas.

Visando obter etanol utilizando polpa de mandioca, Camili e Cabello (2012) variaram a concentração de *Saccharomyces cerevisiae* entre 0,400 e 0,800 g/L para fermentar o hidrolisado por 12 e 24h a 30°C. Ao final da fermentação, os autores obtiveram uma média de resultado na produção de etanol de 73,08 g/L a partir de 178,12 g/L de glicose, obtendo eficiências de 63,09 e 80,33%, ou seja, o rendimento do presente trabalho ficou dentro do esperado.

Bringhenti (2004) avaliou o resíduo da agro industrialização da mandioca como fonte para a fermentação alcoólica, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo e 26 horas de fermentação, pelo balanço de massa observou-se a

formação de 1571g de glicose durante o processo de hidrólise enzimática e ao final do processo fermentativo obteve-se 647,6 mL de etanol, ou seja, um rendimento de 82,42%, igual ao obtido no presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a mesma reúne características nutricionais para o desenvolvimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A melhor condição de hidrólise para a conversão de amido em glicose foi obtida na concentração de 2,0 mL/L da enzima amiloglicosidase na temperatura de 60°C, pH de 4,5 no tempo de 16 horas, com uma eficiência de conversão de 77,2%. Na produção de etanol, utilizando 0,4 g/L de levedura na temperatura de 30°C por 24 horas, foi obtido 4,0 g/L, rendimento de 82% e produtividade de 0,16 g/L.h.

Desta forma verifica-se que o resíduo de manipueira proveniente de fecularia, apresenta-se como uma matéria prima com potencial para a obtenção de etanol, entretanto maiores estudos são necessários. O estudo da aplicação deste resíduo é considerado como uma alternativa promissora no quesito de se obter uma fonte de energia renovável. A preocupação com a sustentabilidade ambiental, aliada ao interesse em aumentar a competitividade de mercado faz com que o aproveitamento da manipueira seja uma alternativa na redução dos rejeitos agroindustriais gerados e um ingrediente na obtenção de produtos de valor agregado.

6 SUGESTÕES

Para dar continuidade no trabalho seria necessário verificar a ação complementar de outras enzimas na hidrólise do amido, aplicar a melhor conversão de hidrólise variando as condições de temperatura e pH na fermentação alcoólica, testar a fermentação com outras linhagens de micro-organismo, testar a suplementação da manipueira com agentes minerais, carboidratos ou outros componentes que podem melhorar o desempenho do micro-organismo aplicado na hidrólise e fermentação alcoólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINI, D., & JUNIOR, H. E. Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural. **Synergismus scyentifica UTFPR**, vol. 2, p. 1-4, 2007.

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

ALBIERO, A. **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas**. 2013. 47p. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis) – Universidade Federal do Paraná.

AMORIM, M. C. C.; SILVA, P.; FERREIRA, I. J. S.; NUNES, A. C. D.; SANTOS, S. G. P.; MOTTA, M. Caracterizacao e avaliação paramétrica da manipueira. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016.

ANDRADE, A. C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo, utilizando lactase e Saccharomyces cerevisiae**. Tese (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis**. 12ed. Washington, s/n., 1094p., 1975.

APAR, D. K.; OZBEK, B. α -Amilase inactivation during corn starch hydrolysis process. **Process Biochemistry**, vol. 39, p.1877-1892, 2004.

AZEVEDO, C. Perspectivas da mandioca. **Sistema FAEP**, Curitiba. 17 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.sistemafaep.org.br/perspectivas-da-mandioca.html#sthash.go7haDYE.dpuf>> Acesso em: 24 abr. 2017.

BALAGOPALAN, C. Cassava utilization in food, feed an industry. **Cassava: Biology, production and utilization**. v. 15, p. 301-318, 2002.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em Saccharomyces cerevisie sob condições não proliferantes**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BIANCHI, V.L.D., CEREDA, M.P. Balanço de massa de uma fábrica de farinha de mandioca de médio porte do Estado de São Paulo. **Energia na Agricultura** (Botucatu), vol.14, n. 3, p. 34-48, 1999.

BIAZUS, J. P. M. et al. Optimization of drying process of Zea mays malt to use as alternative source of amylolytics enzymes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. especial, p.185-190, 2005.

BRINGHENTI, L. **Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca**. 2004. 72p. Dissertação (Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

CABELLO, C. **Identificação de parâmetros para monitoramento de processo contínuo de hidrólise enzimática, na produção de glicose a partir de fécula de mandioca**. Botucatu, 1995. 208p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CABRAL, G. J.; KREMER, H.; TROSSINI, T. **Cachaça**. Florianópolis: UFSC, 2006. Disponível em < www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng1/cachaca.doc >. Acesso em: 08 mai. 2017.

CAMILI, E. A. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem o uso de agentes químicos**. 2007. 78p. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu.

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 processadoras de farinha de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v.5, p. 762-766, 2009.

CAMILI, E. A. CABELLO, C. Produção de etanol a partir de polpa de mandioca. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 27, p. 01-19, 2012.

CARDOSO, Érica. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho**. 2005. 67p. Dissertação (mestrado em Ciências ambientais) – Universidade do extremo Sul de Santa Catarina, Criciúma.

CARVALHO, G.G. P.; FERNANDES, F. É. P.; PIRES, A. J. V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos animais. **Revista Electronica de Veterinaria REDVET**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

CEREDA, M., P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: _____. (coord.). **Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v.4, cap. 1, p.13-3. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas).

CERQUEIRA, V. C. Produção de frutose a partir de hidrolisado enzimático de amido de mandioca. 2012. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183p. Dissertação (Programa

de Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

COLLARES, R. M. **Otimização do processo de hidrólise da mandioca “in natura” com o uso de enzimas amilolíticas e pectinolítica**. 2011. 81p. Dissertação (PPGEPro – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria.

DERAL/SEAB. **Análise da Conjuntura Agropecuária – Mandioca Safra 2014/2015**. Departamento de Economia Rural/Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2017.

EMBRAPA. **Aspectos agroeconômicos da cultura da mandioca**: características e evolução da cultura no Estado de Alagoas entre 1900 e 2004. 2006.

EMBRAPA. Mandioca em números. **Congresso de Mandioca 2017**. 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros> >. Acesso em: 22 jun. 2018.

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

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. da S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.12, n.4, p. 226-232, 2014.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Ed.) **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 21-68, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instrução Normativa 68. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Ministério da Agricultura, 2008.

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. Rio Grande do Sul, 2013.

LAMAISON, F. C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Extração da fécula retida no resíduo fibroso do processo de produção de fécula da mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, n. 1, 2000.

LEONEL, M., CABELLO, C. **Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: glicose e álcool**. In: CEREDA, M.P. (coord.). **Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da**

industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, cap. 22, p.280-290, 2001. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas).

LIMA, U.A. **Beneficiamento e industrialização da mandioca.** Série alimentos. São Paulo: Ministério da Indústria e do Comércio, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciências e tecnologia do Estado de São Paulo. Hamburg. 42p. 1982.

MALDONADO, H.G.; LOPEZ, O.P. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.5, p.373-403, 1995.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MORAES, R. R. **Refratometria.** Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em 30 Jun 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PINTO, P. H. M. **Tratamento de manipueira de feccularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação,** 2008. 87p. Dissertação (Agronomia (Energia na Agricultura)) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

PINTO, P. H. M.; CABELLO, C. Tratamento de manipueira de feccularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 26, n. 3, p. 127 – 140, 2011.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J. C.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 105, n. 1, p. 26 – 30, 1987.

SAITO, I. M.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 21, n. 3, p. 34 – 44, 2006.

SANTOS, R. A. Estudo cinético de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto. 2013. 104p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas.

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica. **Edgard Blücher**, São Paulo, v. 2, p. 15 – 20, 2001.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas.** 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) — Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, J. A. et al. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 695 – 698, 2006.

SILVA, J. et al. Caracterização físico-química da manipueira para a verificação do seu potencial como substrato em processos biotecnológicos. **Simpósio latino americano de ciência de alimentos**, 2015.

SOUZA, R. et al. Hidrólise enzimática de amido de mandioca para sua utilização na produção de licor fermentado saborizado com frutas regionais. **XVII Seminário de Iniciação científica**, 2013.

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology.**, v. 33, n. 4, p. 379 – 384, 2011.

TORRES, Lívia Maria; LEONEL, Magali; MISCHAN, Martha Maria. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Cienc. Rural**. Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1327-1332, 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700030&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 24 jun. 2018.

TIEZZI, V. S. **Aproveitamento de resíduos da indústria de processamento de mandioca para produção de álcool**. 2015. 28 p. Monografia (Curso de graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) — Universidade Federal de Santa Catarina.

URBANO, L. H.; SUMAN, P. A.; LEONEL, M. Rendimento de processo de produção de etanol a partir de manipueira. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, p. 778 – 782, 2009.