

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS – CAMPUS DE BAURU

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais

RENAN AUGUSTO FUGITA

Desidratação e retificação de etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga

Bauru

2014

RENAN AUGUSTO FUGITA

Desidratação e retificação de etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes.

Bauru

2014

Fugita, Renan Augusto.

Desidratação e retificação de etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga/ Renan Augusto Fugita, 2014

56 f.

Orientador: Manoel Lima de Menezes

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2014

1. Amêndoa do caroço de manga. 2. Produção de etanol. 3. Desidratação e Retificação. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incentivo, encorajamento e todo suporte necessário para que este sonho se tornasse realidade.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Manoel Lima de Menezes pela orientação, paciência, dedicação e acima de tudo pelo ser humano digno e íntegro.

Ao Prof. Luiz Carlos pelos ensinamentos durante o período de estágio docência e pela adoção, e por sempre estar disponível como se fosse um dos seus orientados.

Ao Prof. Valdecir por conceder alguns dos reagentes utilizados no projeto.

Aos colegas de laboratório Giovanni, Paulinha, Monstrinho, Aloísio, Ana Paula, Paula Lima, Brunão, Lucas, Bruna, Mayara e Karla por tornarem menos difícil as disciplinas o projeto e a vida.

Aos meus familiares e colegas que acreditaram, incentivaram e deram força.

A CNPQ pela concessão da bolsa.

FUGITA, R. A. “Desidratação e retificação de etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga”. 2014. 56f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais)-UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2014.

RESUMO

Com a expansão da agroindústria a comercialização manga tem demonstrado grande potencial econômico, podendo ser utilizada na formulação de polpa, néctares, sucos, geléias e compotas. Em contrapartida, a industrialização gera uma grande quantidade de resíduos que equivale a aproximadamente 35 a 60% do peso bruto da matéria prima. Por razões sanitárias, a deposição do resíduo deve ser feita em locais distantes da unidade de processamento, o que agrega custo adicional e gera problemas ambientais. Dentro deste contexto o principal objetivo deste trabalho foi obter etanol a partir da amêndoa do caroço de manga e desenvolver uma nova metodologia de desidratação e retificação. Por meio do processo de preparação da matéria prima, hidrólise seguida por fermentação e destilação, obteve-se um resultado por cromatografia gasosa de 275 litros de etanol hidratado para cada tonelada de amêndoa de caroço de manga. Na metodologia desenvolvida para desidratação do etanol hidratado em amostras fortificadas, foram empregados os solventes: glicerina, etilenoglicol e polietilenoglicol como agentes desidratantes, aplicados num processo de destilação com arraste de vapor, obtendo uma relação de agente desidratante / etanol anidro de 1:1,7, 1:1,8 e 1:2, respectivamente. Simultaneamente ao processo de desidratação avaliou-se a retificação do etanol, observando reduções dos componentes presentes no etanol hidratado, da ordem de 90,6, 91,7 e 97,0% (m/v) para glicerina, etilenoglicol e polietilenoglicol, respectivamente. No processo de retificação obteve-se uma redução de 75,0% na acidez de 92,2% na condutividade do etanol retificado. O etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga foi submetido ao mesmo processo de desidratação e retificação desenvolvido, obtendo índices de desidratação de 99,9%(m/v), em um álcool com teor de 88%(m/v). Com relação a eliminação dos demais componentes presentes na referida amostra de etanol, observou-se uma redução de 94,8; 91,5; 97,0 e 100% (m/v), para o acetaldeído, metanol, álcool isoamílico e ácido acético respectivamente, promovendo a redução da acidez e da condutividade. Desta forma pode-se inferir que o novo método mostrou-se adequado para a desidratação e retificação de etanol hidratado.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática, amêndoa de caroço de manga, etanol, retificação.

FUGITA, R. A. "Dehydration and rectification of ethanol produced from almond pits Mango". 2014. 56f. Dissertation (Master in Science and Technology of Materials) -UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2014.

ABSTRACT

With the expansion of agribusiness marketing the mango has shown great economic potential and can be used in the formulation of pulp, nectars, juices, jellies and jams. In contrast, the manufacturing generates a large amount of waste which is approximately 35 to 60% of the gross weight of the feedstock. For health reasons, the deposition of waste should be carried out in remote locations of the processing unit, which adds additional cost and creates environmental problems. Within this context the main objective of this work was to obtain ethanol from mango seed almond and develop a new methodology for dehydration and rectification. By means of the preparation of the feedstock, hydrolysis followed by fermentation and distillation process obtained theoretical results by gas chromatography of 275 liters of hydrous ethanol per ton of almond mango seed. In the methodology developed for dehydrating hydrous ethanol spiked samples, the solvents were employed: glycerin, ethylene glycol and polyethylene glycol as dehydrating agents, applied in a process of steam distillation drag, showed a ratio of dehydrating agent / anhydrous ethanol 1: 1, 7, 1: 1.8 and 1: 2, respectively. Simultaneously, the dehydration process was evaluated rectification of ethanol observing reductions of the components present in hydrous ethanol, in the order of 90.6, 91.7 and 97.0% (w / v) glycerine, ethylene glycol and polyethylene glycol, respectively. In the grinding process yielded a reduction of 75.0% in the acidity of 92.2% in the conductivity of ethanol rectified. The ethanol produced from almond core sleeve was subjected to the same process of dehydration and grinding developed, and obtained from dehydration of 99,9% (m / v) with an alcohol content of 88% (w / v). Regarding the removal of other components present in said sample of ethanol, there was a reduction of 94.8; 91.5; 97.0 and 100% (w / v) for acetaldehyde, methanol, isoamyl alcohol and acetic acid, respectively, promoting the reduction of acidity and conductivity. Thus it can be inferred that the new method was suitable for dehydration and rectification of hydrous ethanol.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, almond mango seed, ethanol rectification.

LISTA DE ABREVIACOES

FAOSTAT	Food And agriculture organization of the united statistics.
IBGE	Instituto brasileiro de geografia estatística
IBRAF	Instituto Brasileiro de Frutas.
CG	Cromatografia Gasosa
FID	Flame Ionization Detector

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Resíduo do processamento da manga de uma indústria em Araguari-MG (CRUZ, 2011).....	5
Figura 2- Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b) (Corradini, E. et al., 2005)	8
Figura 3 - Ação de clivagem da enzima alfa amilase sobre um a estrutura de amido	10
Figura 4 - Ação da enzima amiloglicosidase	11
Figura 5- Esquema do processo de desidratação pelo método de destilação extrativa.....	15
Figura 6- Esquema do processo de desidratação pelo método de destilação azeotrópica	16
Figura 7- Funcionamento de um detector FID.....	19
Figura 8- Esquema de um heaspace produzido pela <i>Perkin Elmer</i> TM	20
Figura 9- Caroço de manga após o despulpamento.....	23
Figura 10- Caroço de manga com amêndoa	24
Figura 11- Amêndoa do caroço da manga	24
Figura 12- Farelo da amêndoa do caroço de manga	25
Figura 13- Liquidificador industrial	25
Figura 14- Reator para hidrólise equipado com aquecedor e agitador.	26
Figura 15- Vinho obtido após a hidrólise enzimática.	26
Figura 16- Centrifuga utilizada para a separação do vinho.....	26
Figura 17- Sistema de cromatografia gasosa equipado com <i>headspace</i>	27
Figura 18- Refratômetro para determinação de grau °Brix	30
Figura 19- Aparato empregado no processo de fermentação e vinho obetido após a fermentação.....	31
Figura 20- Mosto fermentado	31
Figura 21- Aparato instrumental de destilação fracionado empregado na destilação do álcool da manga	33
Figura 22- Aparato instrumetal de destilação empregado para a desidratação do etanol	34
Figura 23- Fórmulas estruturais a) etilenoglicol; b) glicerina; c) polietilenoglicol.	40
Figura 24- Interação do etilenoglicol com água (a), polietilenoglicol com água (b) e glicerina com água.	40
Figura 25- Cromatograma obtido após a injeção de 1.0 µL de uma solução-padrão com níveis de concentração de 570,17 µg L ⁻¹ para o acetaldeído (1), e 2000 µg L ⁻¹ para a acetona (2), acetato de etila (3), metanol (4), n-propanol (5), isobutanol (6), n-butanol (7), isoamílico (8) e ácido acético (9), dissolvido em etanol.....	43
Figura 26- Cromatograma obtido após a injeção de 1,0µL de etanol de manga, picos 1, 2 , 3, 4, 5, 6 e 7 são: acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, isobutanol, n-butanol, isoamílico e ácido acético, respectivamente.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das espécies de manga com sua aplicação culinária (CAMARGO-FILHO; ALVES; MAZZEI, 2004).	4
Tabela 2- Produção brasileira de manga por região fisiográfica em 2011 (IBGE, 2011).....	5
Tabela 3- Composição centesimal das amêndoas contidas no endocarpo da manga da variedade espada e do amido obtido (CAVALCANTI, <i>et. al.</i> , 2013).	6
Tabela 4- Relação de amilose e amilopectina em diferentes fontes de amido.	8
Tabela 5- Descrição das principais enzimas envolvidas na transformação do amido para conversão em etanol.	10
Tabela 6-Comparativo de Rendimento de diferentes matérias primas para a produção de álcool (RIZATO, 2009).	12
Tabela 7- Teor alcoólico em ° GL e INPM, para as diferentes classificações (RIBEIRO, 2007).	13
Tabela 8- Comparativo das tecnologias de desidratação (SEJIMO, 2011).....	17
Tabela 9- Especificações técnicas típicas de etanol de cereais e tuberosas (CUNHA-SALATA, 2012). ..	18
Tabela 10- Volumes dos solventes adicionados a 3,5 litros de etanol hidratado, afim de fortificá-lo.	22
Tabela 11- Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação do teor alcoólico do mosto fermentado	32
Tabela 12- Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação do perfil cromatográfico do etanol obtido a partir do caroço de manga	36
Tabela 13- Análise centesimal da amêndoa caroço de manga utilizado para a produção do etanol	37
Tabela 14- Dados de grau Brix referentes as fases da hidrólise enzimática	38
Tabela 15- Comparativo de rendimento de diferentes matérias primas para a produção de álcool	39
Tabela 16- Teor alcoólico do etanol combustível após a etapa de desidratação com polietilenoglicol, glicerina e etilenoglicol.	41
Tabela 17- Equações das curvas analíticas obtidas para os componentes em uma solução de um padrão misto de diferentes componentes.	44
Tabela 18- Determinação dos níveis de concentração e percentagens de eliminação dos componentes presentes em amostras de etanol combustível antes e após a retificação.	46
Tabela 19- Valores determinados para acidez e condutividade em amostras de etanol fortificado	47
Tabela 20- Determinação dos níveis de concentração e percentagens de eliminação dos componentes presentes em amostras de etanol de caroço de manga antes e após a retificação.....	48
Tabela 21- Especificações técnicas típicas de etanol de caroço de manga	49

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1	Manga.....	4
3.2	Resíduo do processamento da manga	6
3.3	Amido	7
3.4	Enzimas e Hidrólise Enzimática	9
3.5	Bioetanol.....	12
3.6	Desidratação.....	13
3.6.1	Considerações sobre os métodos de desidratação	14
3.7	Retificação	17
3.8	Cromatografia em fase gasosa	19
3.8.1	Headspace	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Reagentes.....	21
4.1.1	Preparação das soluções-padrão de etanol para obtenção da curva analítica, afim de monitorar a fermentação empregando o <i>headspace</i> acoplado ao CG	21
4.1.2	Preparação das soluções-padrão de etanol para obtenção da curva analítica, afim de determinar do grau de hidratação do álcool de manga	21
4.1.3	Preparação das soluções-padrão de solventes para obtenção da curva analítica, afim de determinar o perfil do álcool de manga.....	22
4.1.4	Fortificação da amostra de etanol afim de otimizar a metodologia para determinar o perfil do etanol de manga	22
4.1.5	Amostra do caroço de manga.....	23
4.2	Instrumentação	23
4.2.1	Preparação da amostra	23
4.2.2	Trituração e Homogeneização.....	24
4.2.3	Hidrólise Enzimática	25
4.2.4	Sistema de filtração para separação do vinho obtido após a hidrólise enzimática	26
4.2.5	Sistema de cromatografia gasosa equipado com <i>headspace</i>	27
4.3	Métodos	27
4.3.1	Análise Centesimal	27

4.3.1.1	Determinação da umidade.....	27
4.3.1.2	Proteínas Totais	28
4.3.1.3	Determinação de amido.....	28
4.3.1.4	Determinação do Teor de Cinzas	29
4.3.1.5	Lipídios	29
4.3.2	Hidrólise Enzimática.	29
4.3.3	Determinação °Brix	30
4.3.4	Fermentação Alcoólica	31
4.3.5	Determinação do teor de álcool durante o processo de fermentação	31
4.3.6	Destilação do álcool obtido do caroço de manga	32
4.3.7	Desidratação e Retificação do álcool de manga	33
4.3.8	Determinação da acidez do etanol de manga.....	34
4.3.9	Condutividade elétrica	35
4.3.5	Determinação do perfil cromatografico do álcool obtido do caroço de manga	35
4.3.5.1	Otimização da metodologia analítica empregada na determinação do perfil cromatografico do etanol de manga	35
4.3.5.2	Validação do método	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Análise centesimal	37
5.2	Trituração e Homogeneização	37
5.3	Hidrólise enzimática e Fermentação.....	38
5.4	Otimização da Metodologia para a desidratação do etanol	39
5.5	Otimização de um método analítico para a determinação do perfil cromatografico do etanol retificado	42
5.6	Otimização de um método para retificação do etanol hidratado.....	45
5.6.1	Avaliação da acidez e condutividade em amostras de etanol fortificado	47
5.7	Validação da nova metodologia desenvolvida para a desidratação e retificação do etanol de manga.....	47
6.	CONCLUSÕES	50
7.	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A manga (*Mangífera indica L.*) é dita uma fruta de drupa carnosa, achatada lateralmente, com variações que podem influenciar no tamanho, forma, coloração, presença de fibras, aroma ou sabor da manga. Sua divisão se dá basicamente em casca ou exocarpo, polpa comestível (mesocarpo) e endocarpo (caroço), contendo fibras que podem estar em maior ou menor quantidade dispostas entre a polpa e o caroço (CAVALCANTI, et al., 2011).

Com a expansão da agroindústria, a comercialização da manga tem demonstrado grande potencial econômico, podendo ser utilizada na formulação de polpa, néctares, sucos, geléias e compotas. Em contrapartida, a industrialização gera uma grande quantidade de resíduos que equivale a aproximadamente 35 a 60% do peso bruto da matéria prima. Por razões sanitárias, a deposição do resíduo deve ser feita em locais distantes da unidade de processamento, o que agrega custo adicional e gera problemas ambientais (ROCHA, 2011).

Através da caracterização química do resíduo agroindustrial da manga (casca e semente), determinou-se concentrações consideráveis de proteínas, fibras, lipídeos, ácidos graxos insaturados, carboidratos (amido), que os caracterizam como potenciais ingredientes para serem aproveitados na alimentação animal e humana (VIEIRA, et al., 2009).

O amido apresenta grande importância nutricional e industrial. Encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos. É a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta, e o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados (WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, 2005).

O etanol de segunda geração é produzido realizando um pré-tratamento seguido da sacarificação dos polímeros que constituem a parede vegetal, convertendo-o em moléculas simples passíveis de fermentação (RUBIN, 2008).

O etanol anidro desempenha um papel bastante importante no setor da indústria de combustíveis, por ser utilizado como aditivo oxigenante à gasolina a fim de reduzir os impactos ambientais pela emissão de gases causadores do efeito estufa, conforme demandado para alguns países pelo protocolo de Quioto (ALESSI, 2004).

O etanol puro é obtido a partir de um processo de retificação cuja finalidade é livrar o etanol das impurezas voláteis contidas no flegma. Estas impurezas poder ser divididas em dois

grupos sendo: a) impurezas chamadas de “cabeça”, que contém aldeídos, ésteres; b) Impurezas pesadas chamadas de “cauda”, formadas pelos álcoois superiores comuns: propílico, isopropílico, butílico, isoamílico, pelo aldeído acético e água (CUNHA-SALATA, 2012).

2. OBJETIVOS

Considerando a disponibilidade de material residual de diversos setores agroindustriais e visando agregar valores e reduzir os impactos ambientais, neste trabalho, objetivou-se a produção de etanol empregando a amêndoa do caroço de manga como opção de matriz amilácea.

Objetivos Específicos:

- Avaliar o emprego do caroço de manga como uma nova proposta de biomassa que propicie a produção de bioetanol;
- Desenvolver e otimizar metodologias que permitam a obtenção do etanol em sua forma anidra;
- Desenvolver e otimizar metodologias que permitam efetuar a retificação do etanol anidro;
- Empregar a técnica de cromatografia gasosa para a monitoração da fermentação e qualidade do etanol anidro e retificado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Manga

A manga (*Mangífera indica L.*) é dita uma fruta de drupa carnosa, achatada lateralmente, com variações que podem influenciar no tamanho, forma, coloração, presença de fibras, aroma ou sabor da manga. Sua divisão se dá basicamente em casca ou exocarpo, polpa comestível (mesocarpo) e endocarpo (caroço), contendo fibras que podem estar em maior ou menor quantidade dispostas entre a polpa e o caroço. A casca é lisa, podendo apresentar tonalidade que variam do verde, amarelo, alaranjado até o vermelho (normalmente o lado exposto ao sol (CAVALCANTI, *et al.*, 2011). Pertence à família das Anacardiaceae, e é considerada originária do leste da Ásia com sua área de concentração em Myanmar, Birmânia, Assam e Índia, sendo amplamente cultivada em países tropicais. A inserção da fruta no Brasil se deu por volta do ano 1700 através dos portugueses que também foram os responsáveis por seu nome (PONTES, 2008).

A manga apresenta larga utilização culinária que se estende da a sua forma *in natura* até na formulação de doces e outros tipos de pratos. Na Tabela 1 estão apresentadas algumas espécies de manga relacionadas à sua aplicação culinária (CAMARGO-FILHO; ALVES; MAZZEI, 2004).

Tabela 1- Relação das espécies de manga com sua aplicação culinária (CAMARGO-FILHO; ALVES; MAZZEI, 2004).

Aptidão para uso culinário	Espécies
<i>In natura</i>	Haden, Tommy Atkins, Keity, Palmer, Ruby, Zill e Van Dick.
Compota em calda	Imperial, Carlota, São Quirino, Nom Plus Ultra, Haden, Palmer, Kent e Zill.
Néctar	Carlota, Palmer, Maga Dágua e Sensation

A Tabela 2 apresenta o percentual de produção por região onde é possível destacar que o nordeste e o sudeste do país, detendo praticamente toda a produção nacional.

Tabela 2- Produção brasileira de manga por região fisiográfica em 2011 (IBGE, 2011).

Região	Produção
Nordeste	70,24%
Sudeste	28,44%
Sul	0,78%
Norte	0,29%
Centro-Oeste	0,25%

O Brasil encontra-se numa posição de destaque no cenário mundial de produção da fruta, ficando atrás apenas de Índia, China, Tailândia, Indonésia, Paquistão, México (FAOSTAT, 2011) e em terceira colocação no quesito exportação (VASCONCELOS-TORRES, 2010) com um valor bruto superior a 900 milhões de dólares da fruta fresca e cerca de 2 bilhões de dólares da fruta processada (IBRAF, 2011).

Com a expansão da agroindústria, a manga tem demonstrado grande potencial econômico, podendo ser utilizada na formulação de polpa, néctares, sucos, geléias e compotas. Em contrapartida, a industrialização gera uma grande quantidade de resíduos que equivale a aproximadamente 35 a 60% do peso bruto da matéria prima. Por razões sanitárias, a deposição do resíduo deve ser feita em locais distantes da unidade de processamento, o que agrega custo adicional e gera problemas ambientais (ROCHA, 2011). A Figura 1 ilustra como é realizado o descarte de uma indústria de processamento da manga feito em céu aberto.

Figura 1- Resíduo do processamento da manga de uma indústria em Araguari-MG (CRUZ, 2011).



3.2 Resíduo do processamento da manga

Cavalcanti e seus colaboradores através da caracterização química do resíduo agroindustrial da manga (casca e semente) mostrado na Tabela 3, determinaram concentrações de proteínas, lipídeos e, especialmente, carboidratos que o caracteriza como uma potencial biomassa para a conversão em etanol.

Tabela 3- Composição centesimal das amêndoas contidas no endocarpo da manga da variedade espada e do amido obtido (CAVALCANTI, *et. al.*, 2013).

Análises	Amêndoa da manga	Amido da manga
Umidade (%)	39,74±0,40	13,60 ± 0,20
Cinzas (%)	2,18±0,01	0,02 ± 0,01
Proteína (N x 6,25) (%)	6,95±0,21	1,91 ± 0,21
Lipídio (%)	4,04±0,10	1,66 ± 0,43
Carboidrato (%)*	47,16	82,81
pH	5,63	4,86

* Carboidratos por diferença. Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão).

Um trabalho ainda mais recente mostra que a semente de manga pode ser usada como uma fonte potencial de ingredientes alimentares funcionais, antioxidantes naturais (presença compostos fenólicos e carotenóides), antimicrobianos, produção de cosméticos e carvão ativado, além do seu processamento para a produção de alimentos terapêuticos. Sugerindo assim que a semente da manga deve ser utilizada em vez de simplesmente descartada como resíduo (KITTIPOOM, 2012).

Uma pesquisa sobre inserção do farelo do resíduo de manga na alimentação animal de tilápias do Nilo foi proposto por Lima *et al.* (2011), onde foram avaliados a digestibilidade aparente, desempenho produtivo, rendimento de carcaça, índice hepatossômico, índice de gordura visceros-somática e peso dos órgãos, concluindo que por não serem observados efeitos negativos dos tratamentos sobre as variáveis analisadas o emprego de até 15% de farelo de resíduo de manga na ração das tilápias é possível. Um trabalho similar utilizou o farelo dos resíduos de manga para a suplementação de frangos de corte a fim de avaliar parâmetros ósseos com testes físicos, químicos, mecânicos, bioquímicos e de proteínas colagenosas da tíbia

extraída em diferentes períodos do corte, constatando que o farelo pode ser adicionado a ração sem que haja nenhum comprometimento da estrutura óssea (BIGONHA, 2009).

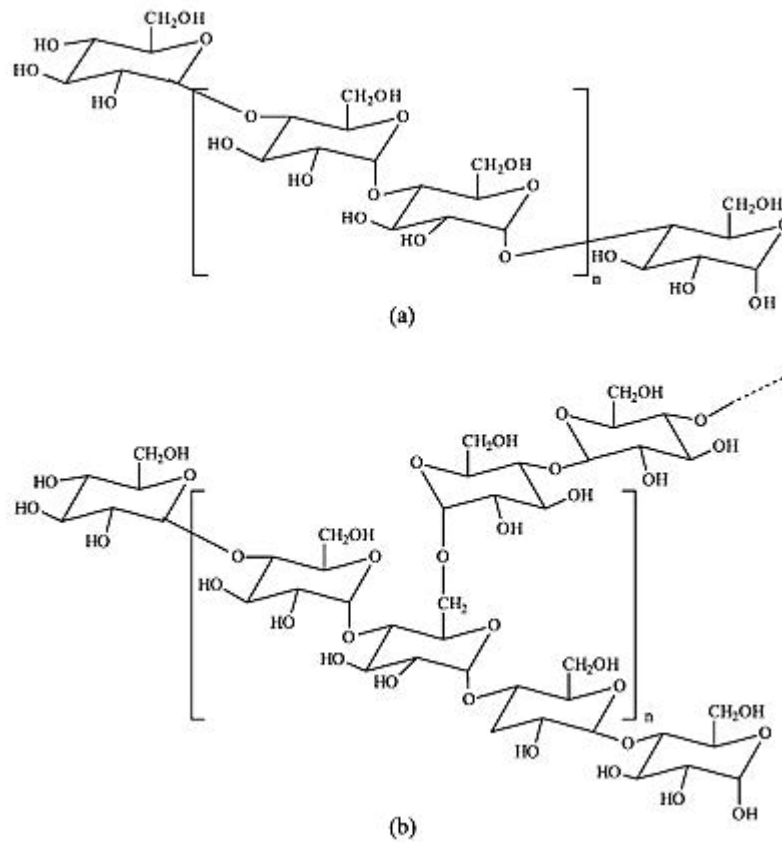
Na alimentação humana foi empregada como ingrediente na elaboração de produtos de panificação (bolo), onde a farinha do caroço da manga mostrou-se atóxica, com alta concentração de fibra bruta (73,12%) e tendo uma boa aceitação entre os provadores (FLORESCIO et al., 2012). Na Nigéria, praticamente o mesmo estudo foi realizado testando o uso de farinha processada, em substituição a farinha de trigo na preparação de biscoitos apresentando potencial comercial e podendo resultar em biscoitos com maior teor de energia e ótima suplementação proteica (AROGBA, 1999).

No setor de agricultura foi avaliada a qualidade da silagem com resíduos de manga com diferentes aditivos como milho desintegrado com palha e sabugo, palha de feijão, sabugo de milho, casca de café evidenciando que o padrão de fermentação das silagens aditivada foi satisfatório, sem haver comprometimento na qualidade fermentativa destas (COUTO-FILHO, 2007).

3.3 Amido

O amido apresenta grande importância nutricional e industrial. Encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos. É a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta, e o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados. Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina conforme Figura 2.

Figura 2- Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b) (Corradini, E. et al., 2005)



A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$, formando uma estrutura ramificada. Embora a amilose seja definida como linear, atualmente admite-se que algumas de suas moléculas possuem ramificações, semelhantes à amilopectina (WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, 2005).

A Tabela 4 apresenta a relação percentual de amilose e amilopectina presentes em amido de alguns produtos naturais.

Tabela 4- Relação de amilose e amilopectina em diferentes fontes de amido.

Produto Natural	% de amilose (a)	% de amilpectina (b)
Amido de milho	24-27	73-76
Amido de arroz	15-18	82-85
Amido de trigo	20-25	75-80
Amido de mandioca	17-20	80-83

(CURVELO-SANTANA et al., 2010), (Modificada).

Cordeiro *et al.* (2013) desenvolveram um estudo da aplicabilidade do amido e da nanocelulose obtidos a partir dos resíduos gerados no processamento agroindustrial da manga em bionanocompósitos poliméricos por meio do processamento do amido (matriz polimérica) e da nanocelulose (fase dispersa), concluindo que estes compostos apresentam-se como uma opção tecnológica para agregação de valor aos resíduos do processamento da fruta.

A redução do impacto ambiental é foco de muitos cientistas nos dias de hoje. No trabalho de TRINDADE-FILHO (2013), este apresenta o amido catiônico como uma alternativa de agente floculante em indústrias de papel, obtendo bom resultado de clarificação da água e quando comparado com um floculante comercial.

A hidrólise enzimática do amido está presente em diversos trabalhos demonstrando uma boa eficiência nos objetivos desejados. Curvelo-Santana, Ehrhardt e Tambourgi (2010) utilizaram o processo de hidrólise enzimática do amido de mandioca utilizando a enzima α -amilase a fim de otimizar o processo de obtenção do álcool deste xarope e concluíram que tanto o método enzimático, quanto a enzima mostraram-se eficazes na transformação de amido em amido resistente (em termos de glicose) aumentando o rendimento da fermentação alcoólica e sendo assim uma alternativa para as indústrias sucroalcooleiras. Demiate, Konkel e Pedroso (2001) utilizaram do método de hidrólise com o intuito de propor uma metodologia mais barata, ágil e confiável para a determinação de amido em amostras.

3.4 Enzimas e Hidrólise Enzimática

Enzimas são substâncias sintetizadas em células vivas e catalisam ou aceleram reações termodinamicamente possíveis, de modo que a velocidade da reação é compatível com o processo bioquímico essencial para a manutenção da célula. Estas estruturas polipeptídicas em condições ideais de temperatura e pH podem ser usadas como complemento em processos industriais, como uma alternativa para aumentar a produtividade, pois as enzimas possuem duas propriedades importantes: a especificidade reacional onde uma enzima só pode catalisar um tipo de reação. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Existem 5 grupos de enzimas envolvendo a transformação do amido: as endo e exo amilases, as desramificantes, que tem como função a hidrólise e as isomerases e as ciclodextrinas glicosiltransferases. Na tabela 5 estão apresentados os principais grupos, organismos

produtores, os substratos específicos e parâmetros de atividade ótima par a conversão do amido em etanol. (MALDONADO; LOPEZ, 1995)

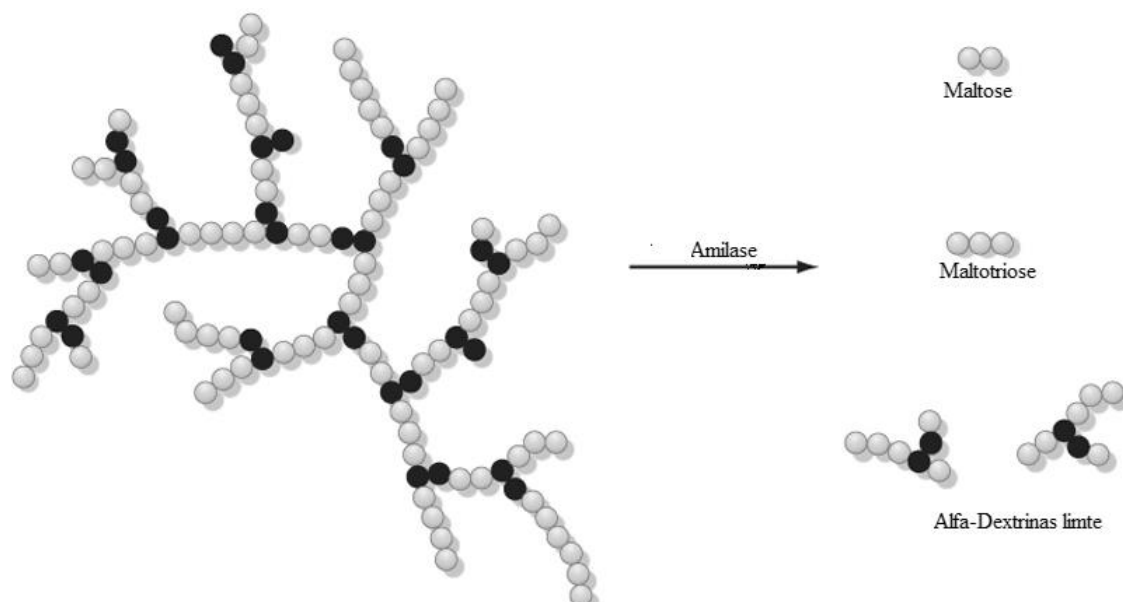
Tabela 5- Descrição das principais enzimas envolvidas na transformação do amido para conversão em etanol.

Tipo	Nome Comum	Microorganismos produtores	Substrato	pH e Temperatura Ótimo	
				pH	Temperatura
Endo -amilase	Amilase bacteriana	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	α -1,4-glicosil α -1,4-glicosil	6.0	65-70°C
				5.0-7.0	90°C
Exo-amilases	Amilase fúngica Amiloglucosidase β -amilase bacter.	<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Clostridium sp.</i>	α -1,4-glicosil α -1,4-glicosil α -1,4-glicosil	4.5	50-60°C
				4.0-5.0	60°C
				5.0	55-60°C
				5.5-6.0	75-85°C
α -1,6-amilase	Pululanase Isoamilase	<i>K. aerogenes</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	α -1,6-maltotriosil α -1,6-Heptasac.	5.0	60°C
				4.0	50-55°C

(MALDONADO; LOPEZ, 1995) (Modificada).

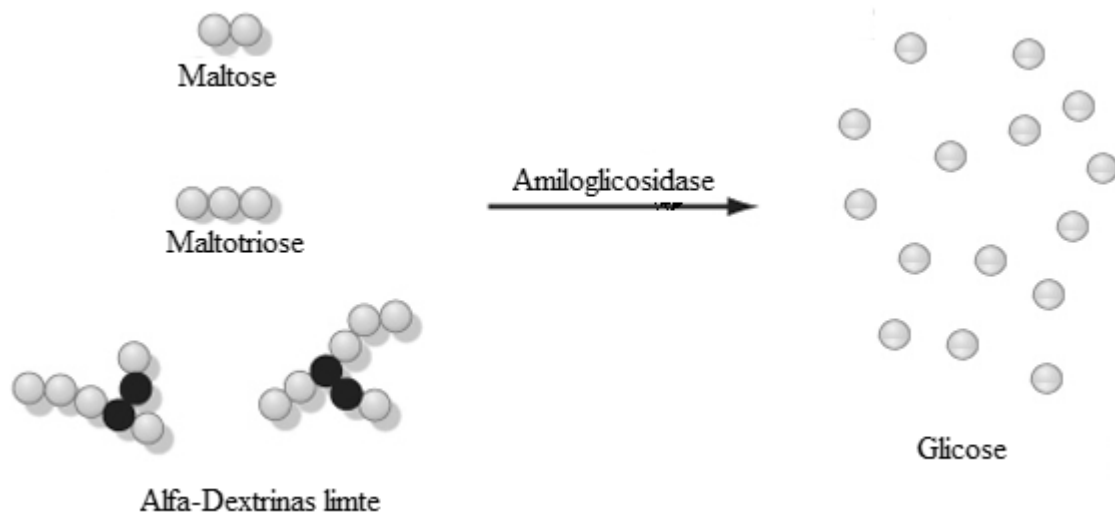
Enzimas como a α -amilase que constituem uma classe de cálcio-metallo-enzimas são usadas na liquefação do amido, na produção de xaropes, bebidas, produção de álcool, em indústrias têxteis, detergentes, entre outras aplicações. As de uso industrial são termoestáveis, com atuação na faixa de 90 a 110°C e pH 6,0 (SURMELY et al., 2002). A figura 3 apresenta uma representação esquemática da ação da enzima.

Figura 3 - Ação de clivagem da enzima alfa amilase sobre um a estrutura de amido



A amiloglicosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações do tipo alfa-1,4 e alfa-1,6. A ação da amiloglicosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (FUJI; HOMMA; TANIGUCHI, 1988). A Figura 4 apresenta uma representação da ação da enzima amiloglicosidase liberando gradualmente unidades de glicose.

Figura 4 - Ação da enzima amiloglicosidase



Durante a hidrólise do amido eliminam-se gradualmente as unidades de glicose na extremidade não redutora da molécula do substrato. A velocidade de hidrólise depende do tipo (linear ou ramificada) e da extensão da cadeia: as ligações alfa – 1,4, se hidrolisam mais facilmente que as ligações alfa – 1,6, porém a maltotriose, e especialmente a maltose hidrolisam-se mais lentamente que os oligossacarídeos. Estas enzimas são termoestáveis (55 – 60°C) em soluções acidificadas, pH 4,0 – 5,5 (PIMENTEL, 1987). A ação sinérgica de alfa-amilase e amiloglicosidase no processo de hidrólise vem sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens, quem em síntese estudaram a eficiência do uso destas duas enzimas em grânulos de amido de arroz, sagu e batata e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos (MONNA et al., 1989).

3.5 Bioetanol

Diante do cenário mundial do petróleo no que diz respeito ao custo e as questões ambientais, surge a necessidade da proposta de novas metodologias tecnológicas para o desenvolvimento da geração de energia a partir de fontes renováveis, tal como o etanol (LIMA, 2011). Duas alternativas vêm sendo estudadas: o etanol de segunda geração utilizando-se de culturas de salgueiro e capim-elefante e o reaproveitamento da biomassa agroindustrial.

A produção do etanol de primeira geração consiste no processo de fermentação de açúcares fermentescíveis presentes do colmo da planta (NAIK *et al.*, 2010). O etanol de segunda geração é produzido realizando a sacarificação dos polímeros que constituem a parede vegetal, convertendo-o em moléculas simples passíveis de fermentação (RUBIN, 2008).

Ainda no Brasil o principal meio de cultura para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, porém outras matérias primas vêm se apresentando com uma rentabilidade significativa como mostra a Tabela 6 (RIZATO, 2009).

Tabela 6-Comparativo de Rendimento de diferentes matérias primas para a produção de álcool (RIZATO, 2009).

Produto	Rendimento (Toneladas / hectare)	Eficiência na Conversão (Litros/tonelada)	Rendimento do Biocombustível (Litros / hectare)
Beterraba	46	110	5060
Cana-de-açúcar	65	70	4550
Mandioca	12	180	2070
Milho	4,9	400	1960
Arroz	4,2	430	1806
Trigo	2,8	340	952
Sorgo	1,3	380	494

No entanto encontram-se difundido na literatura algumas outras formas de obtenção de bioetanol de segunda geração. Segundo Silva (2010), é possível a produção de etanol de segunda geração utilizando a biomassa residual do sistema de decantação da indústria de celulose aplicando a técnica de SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), obtendo uma produção máxima de 77,6 g.L⁻¹ quando a hidrólise foi conduzida em frascos agitados e 74,6 g.L⁻¹ quando conduzido em biorreator.

O babaçu é uma planta que faz parte da família das palmeiras e cujo o fruto subdivide-se em epicarpo, amêndoa e mesocarpo que pode chegar a até 60% de amido. Levado em consideração o alto teor de amido, foi realizada uma hidrólise enzimática com as enzimas

α -amilase e amiloglucosidase obtendo após a fermentação um teor alcoólico máximo de 2,9°GL de etanol (PAVLAK, *et al.*, 2007).

A partir da agroindústria de produção de farinha de mandioca, segundo Bringhenti e Cabello (2005) estimam-se que para cada tonelada de mandioca processada uma quantidade em torno de 100 – 150 kg de resíduos sólidos são gerados, correspondendo a cerca de 67% de amido. Neste mesmo trabalho foi utilizado esse resíduo a fim de convertê-lo através da hidrólise enzimática seguida de fermentação em etanol. Os resultados apontaram que os resíduos agroindústrias da indústria da mandioca mostrou-se adequada para a produção de etanol, com características passíveis de utilizá-lo na indústria farmacêutica e alimentícia.

3.6 Desidratação

Apresentando fórmula mínima C_2H_6O , o etanol ou álcool etílico, é considerado o membro mais importante da classe dos álcoois por sua versátil aplicabilidade tal como: solvente na fabricação de corantes para confeitarias e produtos alimentícios, diluente e clarificador na fabricação de tintas de aviões, vernizes para madeiras e metais, esmaltes polidores de metais, fabricação de seda artificial, plásticos, adesivos, vidros e em óleos e ceras para polidores para calçados, óleos minerais purificados para uso médicos e lubrificantes (FIGUEIREDO-OLIVEIRA, 2010).

O álcool pode ser classificado de acordo com o seu teor alcoólico, podendo ser determinado de duas maneiras distintas: a medida Gay-Lussac (°GL) que mede o percentual em volume à temperatura padrão de 15°C e a medida do Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM) que mede o percentual em peso à temperatura padrão de 20°C. A Tabela 7 apresenta as classificações e os respectivos percentuais alcoólicos em °GL e INPM.

Tabela 7- Teor alcoólico em °GL e INPM, para as diferentes classificações (RIBEIRO, 2007).

Classificação	°GL	INPM
Anidro	99,60	99,30
Fino	96,20	94,10
Extra-fino	96,00	94,10
Neutro	96,00	94,10
Industrial	95,20	93,80
Hidratado carburante	92,60	93,20
De segunda	92,00	88,50

O etanol anidro desempenha um papel bastante importante no setor da indústria de combustíveis, por ser utilizado como aditivo oxigenante à gasolina a fim de reduzir os impactos ambientais pela emissão de gases causadores do efeito estufa, conforme demandado para alguns países pelo protocolo de Quioto (ALESSI, 2004).

O etanol anidro é também usado como reagente químico, solvente orgânico, matéria-prima para muitos produtos químicos importantes e intermediários para medicamentos, plásticos, lacas, ceras, plastificantes, cosméticos. É também utilizado em formulações farmacêuticas, de biodiesel, indústrias eletrônicas e militares (FIGUEIREDO-OLIVEIRA, 2010).

A desidratação do etanol sempre se mostrou um desafio para a indústria. Na década de 50 foi desenvolvido um processo de desidratação por destilação extrativa, que consistia na desidratação do etanol de forma contínua utilizando o glicerol como solvente. O processo mostrou-se ineficiente por apresentar alguns problemas como a degradação e polimerização do solvente, tecnologia e automação ultrapassada. Anos mais tarde algumas usinas brasileiras adotaram o benzeno na destilação azeotrópica, que também teve seu uso abandonado em virtude dos altos custos e sua periculosidade por se tratar de um composto potencialmente cancerígeno, tendo seu uso proibido a partir de 1997, e sendo, portanto necessário à adoção de novos métodos de desidratação. Atualmente, por utilização da infraestrutura pré-existente nas usinas, a maior parte dos produtores de etanol anidro utilizam o processo de destilação azeotrópica com ciclo-hexano (SEJIMO, 2011), conforme serão vistos nos próximos itens.

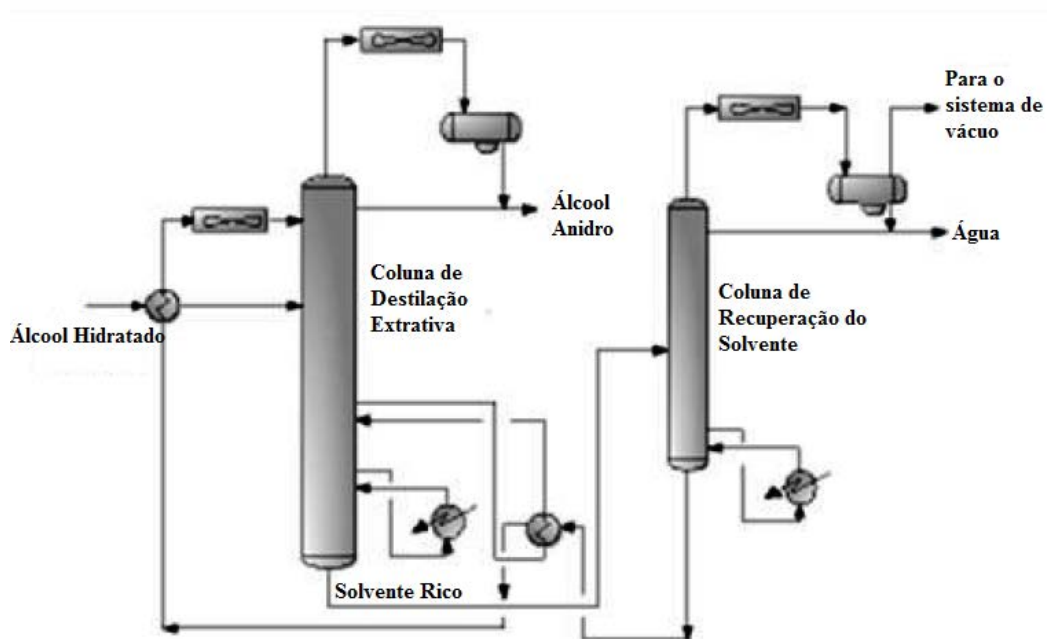
3.6.1 Considerações sobre os métodos de desidratação

Destilação Extrativa: A destilação extrativa consiste na utilização de um solvente a fim de melhorar a eficiência de separação, aumentando a volatilidade relativa de um ou mais componentes.

Nesta destilação o solvente é utilizado como uma terceira substância dentro da coluna destiladora, sendo as outras duas o etanol e a água. O solvente apresenta uma afinidade maior com a água e desta combinação, há a formação de uma mistura menos volátil que o álcool, escoando para o fundo da coluna de destilação.

Dentre os solventes mais utilizados neste processo, destacam-se a glicerina e o etilenoglicol, sendo este o mais utilizado tanto na sua forma pura, quanto misturado com substâncias salinas. A Figura 5 mostra o esquema da destilação extrativa (JUNIOR, 2010).

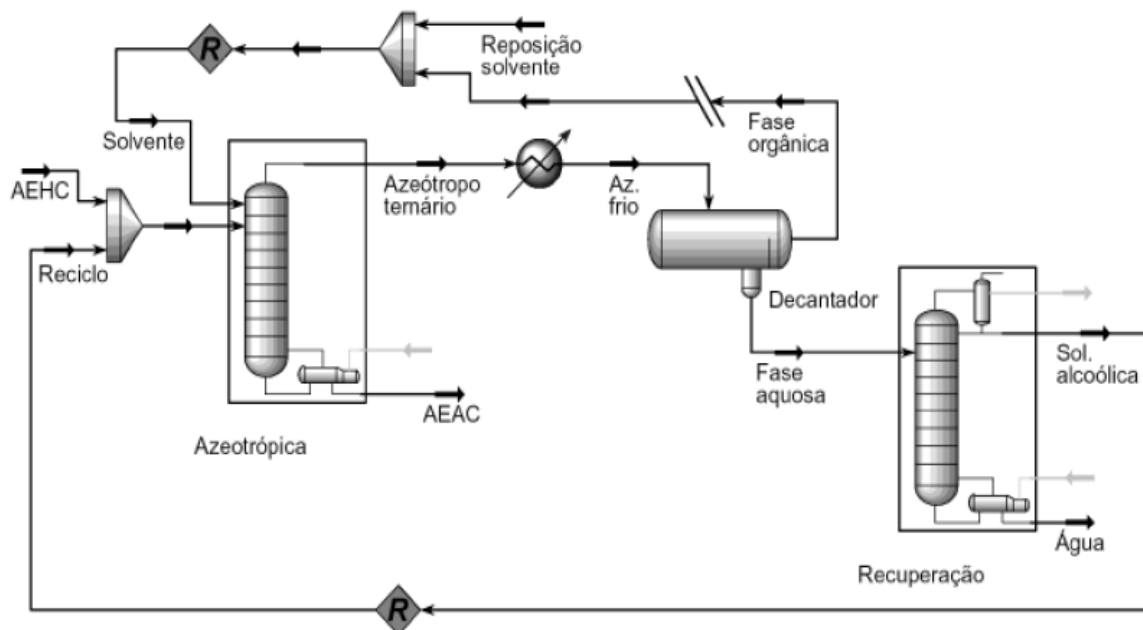
Figura 5- Esquema do processo de desidratação pelo método de destilação extrativa



Destilação Azeotrópica: Neste processo utiliza uma coluna onde o ciclo-hexano é alimentado no topo e o etanol a ser desidratado um pouco abaixo. No topo desta coluna haverá a formação de uma mistura azeotrópica ternária, que após a condensação separar-se-á em um vaso de decantação em uma fase orgânica e aquosa. A fase orgânica retorna à coluna azeotrópica fazendo a reposição do solvente perdido na corrente da base da coluna, a qual terá como produto principal o etanol anidro. Nesta fase há uma contaminação considerável do etanol presente na mistura ternária que passou a fase aquosa sendo necessária sua recuperação em uma coluna específica.

Apesar de ser uma técnica de baixo custo de investimento, apresenta um alto consumo de vapor (1,5 a 1,6 kg de vapor / L álcool), além das perdas significativas do ciclo-hexano como contaminante do álcool anidro e as perdas de etanol na corrente da coluna de recuperação do solvente. A Figura 6 apresenta o esquema da destilação azeotrópica (JUNIOR, 2010).

Figura 6- Esquema do processo de desidratação pelo método de destilação azeotrópica



Desidratação por peneiras moleculares: O método é fundamentado na capacidade do zeólito em aprisionar de maneira seletiva as substâncias presentes em um fluido, líquido ou gasoso. Ao se passar um fluxo de vapor álcool hidratado pelas peneiras, as moléculas de água ficam aderidas em sua estrutura cristalina, justificando assim o termo “peneiras moleculares” (SEJIMO, 2011).

As zeólitas são compostas de alumino silicatos com elevado grau de ordenação estrutural podendo ser obtidas na sua forma natural ou sintética (utilizada para a preparação do álcool anidro). O tamanho assemelha-se a um grão de ervilha, tendo como característica principal poros microscópicos preciso e área superficial grade. Normalmente as zeólitas utilizadas para a desidratação do álcool, apresenta poros de cerca de 3 angstroms. Esse diâmetro de poro é muito pequeno para moléculas de álcool, que apresentam cerca de 4,4 angstroms de diâmetro, mas são suficientemente grandes para que moléculas de água, que têm cerca de 2,8 angstroms de diâmetro permitindo que os poros a adsorvam na grande área interna da zeólita. No processo de purificação do álcool hidratado, a adsorção é um tipo de interação física, que pode ser rapidamente formada e desfeita (SEJIMO, 2011).

A Tabela 8 apresenta um comparativo dos processos de desidratação em relação a alguns parâmetros.

Tabela 8- Comparativo das tecnologias de desidratação (SEJIMO, 2011)

Processo	Destilação Extrativa	Destilação Azeotrópica	Peneira Molecular
Vapor	0,45 a 0,70	1,5 a 1,6	0,55 a 0,80
Água (L/L)	40	65	55
Reciclo de Álcool	10%	0 a 25%	Min. 15%
Energia Elétrica (kWh)	Max. 7,22	Min. 11,1	Min. 9,51
Custo de Investimento	140-160	100	200-250

Modificada

Outros métodos são citados na literatura, porém estes foram destacados pela proximidade metodológica adotada neste trabalho.

3.7 Retificação

A retificação tem a função de eliminar do “álcool fraco” ou “flegma”, todas as impurezas e concentrar o etanol assim purificado, chamado de retificado, até 97 ° GL.

A finalidade da retificação é livrar o etanol das impurezas voláteis contidas no flegma. Estas impurezas poder ser divididas em dois grupos sendo: a) impurezas chamadas de “cabeça”, que contém aldeídos, ésteres; b) Impurezas pesadas chamadas de “cauda”, formadas pelos álcoois superiores comum: propílico, isopropílico, butílico, isoamílico, pelo etanal e água.

As impurezas pesadas, serão encontradas ao final da operação sendo o aldeído acético o produto formado a partir da oxidação do etanol e não da fermentação. Já os ésteres aparecem no final da fermentação, quando esta é realizada com fermentos secundários. Isso normalmente ocorre quando o processo é realizado por longos períodos de tempo o que acarreta em uma diminuição da produção do etanol.

Fica evidente que a finalidade da retificação consiste na remoção das impurezas, logo quanto maior for a separação tanto melhor será o etanol produzido. Esta tentativa já fora realizada pelos químicos por certo tempo, não obtendo resultados satisfatórios, restanto apenas o processo de destilação fracionado que faz de maneira satisfatória a separação entre a cabeça, álcool fino (coração) e cauda. Os dois métodos mais conhecidos para a retificação são de Barbet e Sorel. Enquanto o princípio da teoria de Barbet baseia-se na temperatura de ebulição

de cada impureza, a de Sorel parte das diferentes solubilidades das impurezas em etanol concentrado em ebulição (CUNHA-SALATA, 2012). Desta forma, quando a impureza é pouco solúvel a temperaturas elevadas, os vapores apresentarão altos níveis de impurezas com relação ao etanol ainda na fase líquida. Contudo, se a impureza for muito solúvel no etanol, o processo de destilação não será suficiente para a remoção das impurezas, uma vez que elas se encontrarão na fase líquida. Desse modo, é possível eliminar todas as impurezas de “cabeça”, mesmo com sacrifício de parte do etanol, porém não se consegue eliminar todas as impurezas de “cauda”. É por isso que a simples destilação não consegue purificar o etanol.

O etanol que apresenta a melhor qualidade podendo ser utilizado para qualquer aplicação, desde o consumo humano até o uso veterinário é o etanol neutro. Este é isento de qualquer impureza mas ainda assim preserva o seu odor etílico. Apesar de seu alto grau de pureza, e dependendo da aplicação, pode-se tolerar alguns traços de impureza menos agressivas, principalmente se não for utilizada em produtos de consumo humano interno. A Tabela 9 mostra as especificações técnicas do etanol neutro de cereais e tuberosas (CUNHA-SALATA, 2012).

Tabela 9- Especificações técnicas típicas de etanol de cereais e tuberosas (CUNHA-SALATA, 2012).

	Unidade		Quantidade
Massa específica	g/mL	máximo	0,8071
Grau Alcoólico	% v/v	mínimo	96,1
Acidez em ácido acético	mg/L	máximo	10
Condutividade	S/m	máximo	50
Teste de permanganato a 20°C	Minutos	mínimo	30
Absorbância	220nm	máximo	0,30
Absorbância	230nm	máximo	0,18
Acetal	mg/L		não detectável
Acetona	mg/L		não detectável
Álcoois Superiores	mg/L	máximo	5
Aldeídos	mg/L	máximo	5
Cronaldeídos	mg/L		não detectável
Ésteres	mg/L	máximo	5
Metanol	mg/L	máximo	10
Aspecto	Límpido e isento de materiais em suspensão		
Teste sensorial	Livre de odores estranhos		

Não existe especificação nacional, ou mesmo internacional, que contemple todos os tipos de etanol em comercialização, tudo depende do comprador e a sua finalidade (CUNHA-SALATA, 2012).

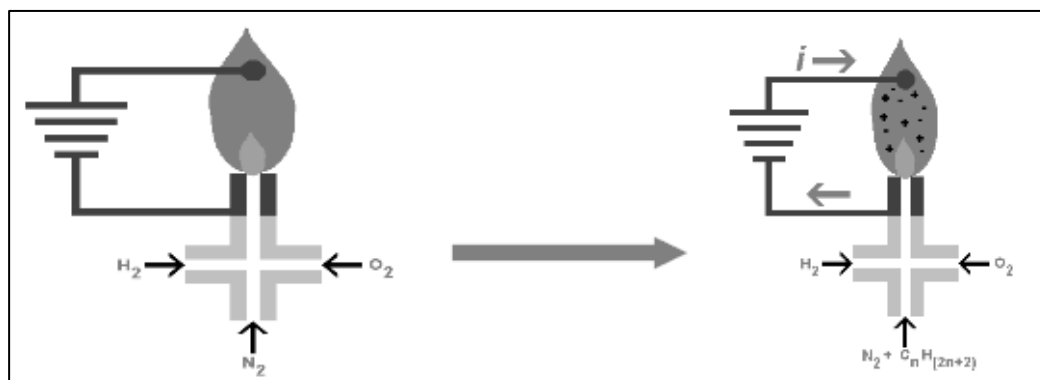
3.8 Cromatografia em fase gasosa

A técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) consiste na separação e análise de mistura de substâncias voláteis. Após a sua vaporização, a amostra é submetida a um arraste por fluxo gasoso de um gás inerte, denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste. O fluxo carrega a amostra até um capilar contendo uma fase estacionária (FE), também denominada de coluna cromatográfica, onde por interações ocorre a separação das diferentes substâncias presentes na amostra. A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia gás-sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia gás-líquido com coluna empacotada ou recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia à gás de alta resolução).

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector, que trata-se, de um dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é uma imagem denominada cromatograma, sendo as substâncias presentes na amostra representadas por picos com áreas proporcionais a sua massa, permitindo assim, sua quantificação (LANÇAS, 1993, MENDHAM et al., 2002, SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

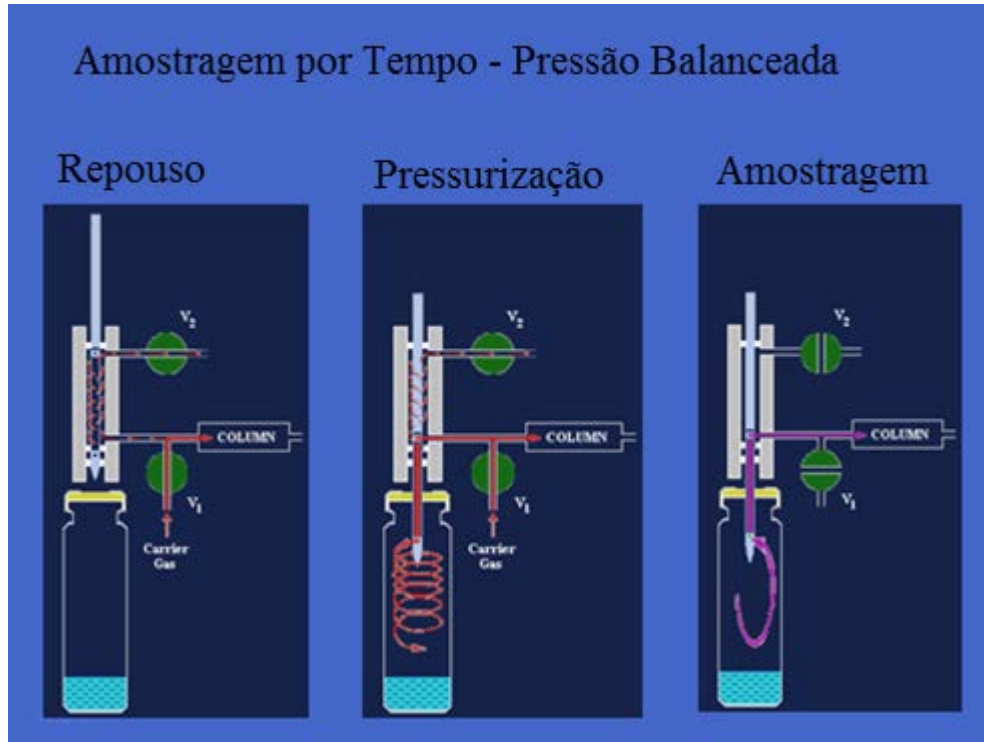
O detector FID (*flame ionization detector*) ou DIC, é o tipo mais comum utilizado na técnica de cromatografia gasosa. O eluente da amostra é misturado ao hidrogênio e ar no queimador, onde entrará em ignição elétrica. Uma característica da maior parte dos compostos orgânicos é que quando submetidos à uma pirólise na temperatura de chama de uma mistura de hidrogênio/ar, produzem íons e elétrons que terão a capacidade de conduzir a corrente elétrica através da chama, conforme Figura 7 (MENDHAM et al., 2002, SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

Figura 7- Funcionamento de um detector FID



Em torno de três décadas, a cromatografia gasosa vem sendo aplicada na determinação de etanol, sendo atualmente considerada como uma técnica de referência. O uso da injeção direta e o *headspace* são os métodos mais difundidos, embora o último apresente algumas singularidades como prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor (CORRÊA; PEDROSO, 1997).

Figura 8- Esquema de um heaspace produzido pela *Perkin Elmer*™.



A análise por headspace é geralmente definida como uma extração fase-vapor, envolvendo a partição do analito entre um líquido não volátil ou fase sólida e a fase vapor acima do líquido ou sólido. É esperado que a mistura da fase vapor seja menos complexa do que a amostra de origem, sendo esta transferida para o cromatógrafo ou outro instrumento para a análise (KOLB, 1999, SNOW; SLACK, 2002).

A determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada é uma característica bastante importante da cromatografia, pois possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo gasoso. Isto se torna mais crítico principalmente devido à baixa detectabilidade dos detectores cromatográficos e a indesejável contaminação da coluna por resíduos não-voláteis (LANÇAS, 1993, KOLB 1999, GOBATO; LANÇAS, 2001). A Figura 8 apresenta o esquema do *headspace*, produzido pela *Perkin Elmer*, empregado neste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os solventes: etanol absoluto, acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico e n-hexano; os ácidos: acético, sulfúrico, clorídrico, nítrico e bórico, bem como sulfato de cobre e hidróxido de sódio P.A foram adquiridos junto a Merck, (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). O solventes desidratantes tais como etilenoglicol, glicerina e polietilenoglicol, de alta pureza foram adquirido junto a Sigma Aldrich (Sima-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo). As enzimas α -amilase (Liquozyme Supra 2.2x), e amiloglicosidade (Saczyme 750), foram adquiridas junto a Novozymes, (Novozymes Latin America Ltda, Araucária, Paraná). O fermento biológico contendo leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), da marca Mauri foi adquirido junto a supermercados na região de Bauru. Foram adquiridos 10 litros de etanol combustível, junto a postos de serviço na região de Bauru.

4.1.1 Preparação das soluções-padrão de etanol para obtenção da curva analítica, afim de monitorar a fermentação empregando o *headspace* acoplado ao CG

Para a preparação das soluções de etanol com concentração 40, 20 e 10 g.L⁻¹, fez-se a transferência de volumes conhecidos de etanol anidro para balões volumétricos com capacidade de 50 ml e o volume completado com água destilada.

4.1.2 Preparação das soluções-padrão de etanol para obtenção da curva analítica, afim de determinar do grau de hidratação do álcool de manga

Para a preparação das soluções de etanol com concentração 40, 20 e 10 g.L⁻¹, fez-se a transferência de volumes conhecidos de etanol anidro para balões volumétricos com capacidade de 50 ml e o volume competado com acetona.

4.1.3 Preparação das soluções-padrão de solventes para obtenção da curva analítica, afim de determinar o perfil do álcool de manga

Quantidade conhecidas de acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, n-propanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico e ácido acético foram transferidos para balões volumétricos de 10 ml e os volumes foram completados com etanol absoluto, obtendo concentrações de 500, 1000 e 2000 mg. L⁻¹.

4.1.4 Fortificação da amostra de etanol afim de otimizar a metodologia para determinar o perfil do etanol de manga

Considerando-se que o volume obtido de etanol obtido da amêndoa do caroço da manga, foi relativamente pequeno, toda a metodologia foi otimizada utilizando-se etanol combustível, adquirido junto a um posto de gasolina, na região de Bauru, próximo a UNESP. A fortificação da amostra foi realizada adicionando-se volumes conhecidos dos solventes em estudo, a 3,5 litros de etanol hidratado. A Tabela 10 apresenta os volumes e as concentrações finais obtidas após a diluição dos respectivos solventes determinados através da cromatografia gasosa.

Tabela 10- Volumes dos solventes adicionados a 3,5 litros de etanol hidratado, afim de fortificá-lo.

<i>Solventes</i>	<i>Concentração (mg.L⁻¹)</i>
Acetaldeído	570,17
Acetona	1203,50
Acetato de etila	1248,79
Metanol	1118,91
Propanol	1271,08
Isobutanol	911,84
Butanol	857,42
Isoamílico	943,58
Ácido acético	710,90

4.1.5 Amostra do caroço de manga

Os caroços de manga foram fornecidos pela fazenda “José e Maria” localizada na cidade de Fernão, interior do estado de São Paulo. Os mesmos foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas. É importante enfatizar que os caroços de manga foram coletados, sem levar em consideração a espécie de manga.

4.2 Instrumentação

4.2.1 Preparação da amostra

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram as etapas de abertura do caroço, até a obtenção da amêndoa que será a biomassa de interesse para este trabalho. A Figura 9 ilustra o caroço obtido após o processamento da manga.

Figura 9- Caroço de manga após o despulpamento



A abertura dos caroços foi realizada manualmente com o auxílio de uma faca comum, obtendo-se o caroço aberto conforme a Figura 10.

Figura 10- Carço de manga com amêndoa



Com o caroço aberto fez-se a separação da casca e da amêndoa (Figura 11), que será o material de interesse.

Figura 11- Amêndoa do caroço da manga



As amêndoas foram mantidas sob refrigeração até o momento de seu processamento.

4.2.2 Trituração e Homogeneização

Foram transferidos 500g de amêndoas para um liquidificador industrial (Figura 13) e, estas foram trituradas até a obtenção de um farelo fino. A Figura 12 apresenta o farelo obtido.

Figura 12- Farelo da amêndoa do caroço de manga



Figura 13- Liquidificador industrial



Após a obtenção do farelo foram adicionados 3,0 litros de água desmineralizada, obtendo uma relação substrato / água na razão de 6:1 (v/v).

4.2.3 Hidrólise Enzimática

A suspensão obtida no processo de homogeneização, descrita no item 4.2.2 foi transferida para um reator com capacidade 10 litros, equipado com agitador mecânico e aquecedor. A Figura 14 apresenta o reator empregado.

Figura 14- Reator para hidrólise equipado com aquecedor e agitador.



4.2.4 Sistema de filtração para separação do vinho obtido após a hidrólise enzimática

Após as etapas de hidrólise a suspensão foi submetida à filtração realizada com auxílio de uma centrífuga. A Figura 16 apresenta o equipamento empregado e a Figura 15 o vinho obtido após a centrifugação.

Figura 15- Vinho obtido após a hidrólise enzimática.



Figura 16- Centrífuga utilizada para a separação do vinho.



4.2.5 Sistema de cromatografia gasosa equipado com *headspace*.

A determinação dos teores de álcool durante o processo de fermentação, bem como após os processos de desidratação e a determinação do perfil do álcool de manga foram efetuadas por um sistema de cromatografia gasosa, equipado com *headspace*, detector de ionização de chama e uma coluna cromatografica capilar Elite Wax™, modelo Clarus 600, adquirido junto a *Perkin Elmer*, (*Perkin Elmer Instruments LLC*, Shelton, USA.). A Figura 17 apresenta o equipamento empregado nas referidas determinações.

Figura 17- Sistema de cromatografia gasosa equipado com *headspace*.



4.3 Métodos

4.3.1 Análise Centesimal

4.3.1.1 Determinação da umidade.

A umidade foi determinada transferindo-se 2,000g do farelo para uma cápsula de porcelana previamente pesada em balança semi-analítica. Manteve-se em estufa a 105°C por

duas horas. O Procedimento foi repetido várias vezes até a obtenção de peso constante. Este procedimento foi realizado em triplicada, em conformidade com a metodologia sugerida pela AOAC (AOAC,1997).

4.3.1.2 Proteínas Totais

Transferiu-se com exatidão 0,200g do farelo do caroço de manga, para um tubo de ensaio de vidro termoresistente, seguido pela adição de 0,5g de sulfato de cobre (CuSO_4), 1,0g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e 5mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo com a mistura foi submetido a aquecimento em um bloco digestor, aumentando-se a temperatura gradativamente em intervalos de 100°C/h, até 400°C. Retirou-se a mistura do aquecimento quando a mesma apresentou-se incolor. Esperou-se a mistura resfriar-se, e colocou-se em um sistema de destilação por arraste de vapor, onde se reagiu com cerca de 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40%. Coletou-se o hidróxido de amônio formado em um elernmeyer contendo 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) 2% (m/v). O destilado foi titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico 0,1M, previamente padronizado. Este procedimento foi realizado em triplicada, de acordo com a metodologia sugerida pela AOAC, (AOAC, 2007).

4.3.1.3 Determinação de amido

Transferiu-se com exatidão 0,200g de farelo para um béquer. Adicionou-se 42 mL de água deionizada e ajustou-se o pH da solução para 7,0 com auxílio de um pHmetro. Adicionou-se 100 μL de enzima α -amilase e deixou-se no banho por 2 horas a 90°C. Deixou-se a solução resfriar até próximo de 60°C e ajustou-se o pH para 5 utilizando ácido clorídrico 0,1M. Adicionou-se 100 μL de enzima amiloglicosidase e deixou-se no banho por 2 horas a 60°C. Deixou-se a solução resfriar e ajustou-se o pH para 7 utilizando hidróxido de sódio 0,1M. Transferiu-se quantitativamente a solução contida no béquer para balão volumétrico de 250 ml e dilui-se até o menisco. Pipetou-se 5 ml da solução e transferiu-se para um balão de 100 ml e dilui-se até o menisco. Filtrou-se a solução, transferiu-se 0,5 ml do filtrado em tubo de ensaio seguido pela adição de 3 ml de água deionizada e 1,0 ml do reagente de Somogyi. A solução obtida foi submetida ao aquecimento em banho-maria a 95°C por 10 minutos. Retirou-se os

tubos do banho e resfriou-se em água corrente. Adicionou-se ao tubo 1,0 mL do reagente de Nelson e agitou-se bem a solução. Completou-se o tubo com 3 mL de água destilada. Em seguida, mediu-se a absorção em um espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda na região do visível (535 nm). Este procedimento foi realizado em triplicada, de acordo com a metodologia sugerida pela AOAC, (AOAC, 2007).

4.3.1.4 Determinação do Teor de Cinzas

Primeiramente calcinou-se o cadinho no forno mufla a 550°C para obter massa constante do mesmo. Ao cadinho previamente pesado adiciona-se uma massa de 2,0 g da amostra. Esta foi incinerada com o auxílio de um Bico de Bunsen até observar a formação de “cinzas”, resultante da queima inicial da matéria orgânica adicionada. O cadinho com as cinzas foi inserido no forno mufla e mantido sob aquecimento de 550°C até a obtenção de massa constante. Este procedimento foi realizado em triplicada, de acordo com a metodologia sugerida pela AOAC, (AOAC, 2007).

4.3.1.5 Lipídios

Primeiramente deixou-se um balão volumétrico na estufa a 105°C por duas horas. Este procedimento foi repetido várias vezes até a obtenção de massa constante. Uma massa de 3,0g de farelo foi pesada e transferida para um papel de filtro, amarrando-o com uma linha e inserindo em um extrator Soxhlet contendo hexano. Deixou-se o refluxo ligado e o farelo sendo lavado por aproximadamente 5 horas. O hexano do balão volumétrico foi removido com auxílio de um rotaevaporador, até observar o aparecimento do resíduo de ácidos graxos. Este balão foi mantido em uma estufa com temperatura ajustada em 105 °C, até obtenção do peso constante. Este procedimento foi realizado em triplicada, de acordo com a metodologia sugerida pela AOAC, (AOAC, 2007)

4.3.2 Hidrólise Enzimática.

A solução obtida no processo de homogeneização, descrita no item 4.2.2 foi transferida para um reator com capacidade de 10 litros. O processo de hidrólise foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, a temperatura do reator foi ajustado em $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, o pH da mistura reacional para 5,5, seguido pela adição de 5,0 mL da enzima α -amilase (Liquozyme Supra 2.2x – 300 KNU) e, 100 mg de cálcio na forma de cloreto, mantendo o sistema sob agitação constante por duas horas. Na segunda etapa, após o resfriamento do reator até a temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ajustou-se o pH para 4,5, seguido pela adição de 5,0 mL da enzima amiloglicosidade (Saczyme 750 – 750 AGU). O sistema foi mantido sob estas condições e agitação constante por duas horas. Após o resfriamento do reator, a solução obtida foi centrifugada, empregando uma centrifuga de cesto, descrita no item 4.2.4.

4.3.3 Determinação °Brix

Afim de monitorar e avaliar a evolução das etapas de hidrólise enzimática, realizou-se a leitura do grau °Brix, com auxílio de refratrometro portatil, modelo Q667, adquirido junto a Quimis,(Quimis do Brasil, São Paulo). A Figura 18 apresenta o modelo do refratômetro utilizado. As leituras foram realizadas em 4 momentos: na preparação da suspensão, após o aquecimento da suspensão a 90°C , decorridas duas horas da hidrólise com a enzima α -amilase e, no instante seguinte ao resfriamento do reator após a hidrólise com a enzima amiloglicosidase.

Figura 18- Refratômetro para determinação de grau °Brix



4.3.4 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica foi realizada em um banho-maria com temperatura ajustada em $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O hidrolisado obtido foi transferido para quatro frascos de polietileno, em uma configuração que pode ser observada na Figura 19. Foram adicionados 30 g de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), para cada 500 ml de mosto e pH ajustado para 4,5. O processo de fermentação foi mantido sob estas condições por 48 horas, obtendo o fermentado apresentado na Figura 20.

Figura 19- Aparato empregado no processo de fermentação e vinho obtido após a fermentação



Figura 20- Mosto fermentado



4.3.5 Determinação do teor de álcool durante o processo de fermentação

As determinações dos teores de álcool durante o processo de fermentação foi efetuada pelo método de cromatografia gasosa equipado com *headspace*, como foi descrito no item 4.2.5. Uma alíquota de 10 ml do fermentado foi transferido para um “vial” específico de

headspace e, o mesmo foi colocado no carrossel, onde foi injetado 10 μL de vapores da amostra. As condições cromatográficas otimizadas são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação do teor alcoólico do mosto fermentado

<i>Parâmetros cromatográficos</i>	
Equipamento	CG – Headspace - Clarus 600, Perkin Elmer
Coluna capilar	Elite Wax (30mm x 0,25mm x 0,25 μm) polietileno glycol
Gás de arraste	Nitrogênio (1,0 mL min ⁻¹)
Modo de injeção	Split 1:20
Volume de injeção	20 μL
Deteção	Ionização de chama
Temperatura detector	300 °C
Temperatura injector	120 °C
Temperatura isotérmica	70°C/4min
<i>Programação de temperatura do <u>Headspace</u></i>	
Agulha	120°C
Temperatura de transferência	120°C
Temperatura do do forno	80 °C
Tempo de termostatização	20 min
Pressurização	20 psi/2min
Volume de injeção	10 μL

4.3.6 Destilação do álcool obtido do caroço de manga

Para a separação do álcool obtido, foi realizada uma destilação fracionada com um sistema contendo um balão de fundo redondo de 500 ml, uma manta de aquecimento, coluna de Vigreux (25mm x 500mm), condensador Liebig (300mm) e um balão de fundo chato de

100 ml para a coleta do álcool destilado. A Figura 21 apresenta o aparato de destilação fracionada empregado.

Figura 21- Aparato instrumental de destilação fracionado empregado na destilação do álcool da manga



4.3.7 Desidratação e Retificação do álcool de manga

A otimização do método de desidratação do álcool foi realizada em um aparato de destilação piloto composto por três balões, onde ao primeiro foi adicionado o etanol combustível hidratado (teor alcoólico de 88%) conforme descrito no item 4.1.4, e aos outros dois, foram adicionados alíquotas de 50 ml de glicerina, como agente desidratante. O sistema foi mantido sob aquecimento, com a temperatura ajustada em $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em banho de glicerina. O álcool hidratado foi levado à ebulição borbulhando seus vapores no segundo balão, seguido pela transferência dos vapores deste etanol parcialmente anidro para o terceiro balão e por fim ao condensador. Para a avaliação da desidratação foram coletadas 20 frações de 10 mL, totalizando um volume final de 200 ml. O mesmo procedimento foi realizado empregando os agentes desidratantes; etilenoglicol e polietilenoglicol. O sistema de desidratação empregado pode ser observado na Figura 22.

Figura 22- Aparato instrumental de destilação empregado para a desidratação do etanol



4.3.8 Determinação da acidez do etanol de manga

A determinação da acidez total do etanol anidro e hidratado foi realizada por volumetria, que consistiu em titular a amostra com solução de hidróxido de sódio padronizado, utilizando α -naftolftaleína como indicador, específico para a determinação do ponto final da titulação. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 5 ml de água destilada foi transferida para um erlenmeyer de 100 ml, seguido pela adição de 5 ml da amostra de etanol e 3 gotas da solução indicadora de α -naftolftaleína. A titulação foi realizada com hidróxido de sódio 0,02N até a viragem para azul clara. O volume gasto foi anotado e a acidez calculada. Os procedimentos foram realizados em amostras de etanol antes e depois do processo de desidratação e retificação.

4.3.9 Condutividade elétrica

Para a determinação da condutividade elétrica do álcool foi utilizado um condutivímetro, equipado com uma célula de condutividade com constante de 1 cm e adotando como unidade de medida $\mu\text{S}/\text{m}$ e temperatura de 23°C , adquirido da Tecnopon. Após a calibração do equipamento, fez-se a imersão do eletrodo em um volume de 100 ml de álcool até a sua estabilização. Os dados foram coletados em triplicada para uma maior confiabilidade. Os procedimentos foram realizados em amostras de etanol antes e depois do processo de desidratação e retificação.

4.3.5 Determinação do perfil cromatografico do álcool obtido do caroço de manga

4.3.5.1 Otimização da metodologia analítica empregada na determinação do perfil cromatografico do etanol de manga

A otimização cromatografica para a determinação do perfil cromatografico do etanol obtido fez-se necessária, uma vez que não há na literatura uma metodologia adequada para a realização destes ensaios. Inicialmente injetou-se concentrações $1,0\mu\text{L}$ de cada solução-padrão dos solventes; acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico e ácido acético, com concentração conhecida, afim de determinar os respectivos tempos de retenção. Uma vez efetuado este ensaio, foi injetado $1,0\mu\text{L}$ da solução-padrão com uma concentração de $2000\mu\text{g L}^{-1}$, para cada solvente em estudo. Desta forma foi possível ajustar as condições cromatograficas adequadas para determinar os níveis de concentrações dos componentes em estudos, presentes em amostras de etanol obtido a partir do caroço de manga. As condições cromatograficas otimizadas pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12- Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação do perfil cromatográfico do etanol obtido a partir do caroço de manga

<i>Parâmetros cromatográficos</i>	
Equipamento	CG – <i>Headspace - Clarus 600, Perkin Elmer</i>
Coluna capilar	Elite Wax (30mm x 0,25mm x 0,25 μ m) polietileno glicol
Gás de arraste	Nitrogênio (1,0 mL min ⁻¹)
Modo de injeção	Split 1:20
Volume de injeção	1,0 μ L
Deteção	Ionização de chama
Temperatura detector	300 °C
Temperatura injetor	250 °C
Temperatura do forno	35°C/4,5min, 20°C/min até 200°C/0,1 min.
Tempo de análise	10,1min.

4.3.5.2 Validação do método

Após a otimização da metodologia para a desidratação e retificação do etanol, bem como a determinação dos parâmetros cromatográficos para a determinação do teor alcóolico e perfil cromatográfico empregando o etanol hidratado obtido em postos de serviços, a metodologia otimizada foi empregada para efetuar a desidratação e retificação, bem como efetuar a determinação do teor alcóolico e o perfil cromatográfico do etanol obtido a partir do caroço de manga.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise centesimal

Os resultados da análise centesimal do farelo da amêndoa do caroço de manga encontram-se na tabela 13.

Tabela 13- Análise centesimal da amêndoa caroço de manga utilizado para a produção do etanol

Componentes	(%)*
Umidade	26,1±1,1
Proteínas Totais	7,82±1,37
Amido	56,06±6,67
Teor Cinzas	1,67±0,28
Lipídeos	8,35±1,50

*Valores médios expressos com base na matéria seca

Da análise da tabela é possível observar que a quantidade de amido existente na amêndoa do caroço da manga apresenta um valor consideravelmente alto o que motivou o estudo da viabilidade da conversão deste, em açúcares redutores passíveis de fermentação e conversão em etanol.

5.2 Trituração e Homogeneização

A trituração das amêndoas com a utilização do liquidificador industrial, forneceu um farelo finamente dividido e uniforme o que favoreceu a etapada de diluição e homogeneização da amostra. Utilizando uma massa de 500g de farelo fez-se a adição de água em alíquotas de 500 ml e analisando suas características, até chegar em uma razão ótima de 1:6 (farelo: água). Esta proporção mostrou-se adequada uma vez que não foi observada a gelatinização do amido, o que dificultaria a ação das enzimas.

5.3 Hidrólise enzimática e Fermentação

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo Curvelo-Santana et al. (2010), onde foi adicionados 1,0 mL de enzima para cada 100g de amostra e adição de 100 mg de cálcio, como ativador da enzima. Os ensaios foram realizados com o monitoramento do grau °Brix, afim de encontrar o melhor tempo para garantir o maior rendimento no processo de hidrólise. A Tabela 14, apresenta o valores do grau °Brix determinados de diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 14- Dados de grau Brix referentes as fases da hidrólise enzimática

Momento	Adição de enzimas	°Brix
T ₀	-----	2,5± 0,2
T ₁	-----	5,0 ± 0,2
T ₂	α-amilase	8,5 ± 0,2
T ₃	amiloglicosidase	10,0 ± 0,2

A fim de avaliar as condições utilizadas na hidrólise enzimática, fez-se a análise centesimal do material sólido residual desta etapa, obtendo um valor de 1,09% de amido. Este dado nos permite apontar um rendimento de 98,06% na conversão de amido em açúcares fermentescíveis.

Na etapa de fermentação foi desenvolvido um aparato piloto conforme descrito no item 4.3.4 para a conversão dos açúcares redutores em etanol. Para a fermentação foram estudados o volume de mosto e a massa de cepa utilizada em cada um dos recipientes, assim como tempo de fermentação.

Após os ensaios foram adotados como parâmetros o volume de 500 ml de mosto o que atinge metade da capacidade total do recipiente, 30 g de leveduras (2 tabletes de fermento comercial) e tempo de fermentação de 48 horas foi definido após o monitoramento visual da formação de bolhas de gás carbônico provenientes da fermentação $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$ e com auxílio da técnica cromatografia gasosa equipada com *headspace*.

Após as determinações do teor alcóolico, em amostras do vinho fermentado, foi observado a produção de 137,5 mL de etanol em 500g da amendoa de manga. Desta forma pode-se inferir que em 1000 kg de amêndoa de manga, após o processo de hidrólise seguido por 48 horas de fermentação pode produzir 275 litros de etanol. Comparando-se esta produção

de etanol a partir de amêndoa de manga, com outras matérias primas produtoras de etanol, comopode ser observado na Tabela 15, classifica o caroço de manga em posição de destaque, podendo este ser inserido como mais uma alternativa de matriz energética no cenário brasileiro, para produção de etanol.

Tabela 15- Comparativo de rendimento de direfentes matérias primas para a produção de álcool

Produto	Rendimento (Toneladas/hectare)	Eficiência na Conversão (Litros /tonelada)
Arroz	4,2	430
Milho	4,9	400
Sorgo	1,3	380
Trigo	2,8	340
Mandioca	12	180
Beterraba	46	110
Cana-de-açucar	65	70
Manga	17*	275

(RIZATO, 2009) ,(Modificada), *O caroço da manga correnponde 11,9% da manga,(VIEIRA, P. A. F. et al.,2009).

Portanto a metodologia desenvolvida, otimização e os resultados obtidos evidenciaram que o caroço da manga, um resíduo agroindustrial, tem potencial para agregar valor ao fruto que é comercializado em diferentes países do mundo. É importante enfatizar que, no Brasil até a presente data, os resíduos agroindustrias de caroço de manga provenientes de fabricas de sucos são descartados em aterros sanitários. Com esta nova aplicação deste resíduo, o emprego deste na produção de bioetanol irá mitigar significativamente a poluição ambiental.

5.4 Otimização da Metodologia para a desitratção do etanol

Qualquer tentativa de desidratar o etanol hidratado por destilação simples a concentrações maiores que 96,5 °GL é impossível. Isto se deve ao fato do álcool etílico formar mistura azeotrópica, por de ligações de hidrogênio com a água. As misturas azeotrópicas caracterizam-se por terem a mesma composição tanto na fase líquida quanto na fase vapor, (CUNHA-SALATA, 2012). Desta forma, no desenvolvimento deste trabalho foram avaliados

três solventes como agentes desidratantes, sendo eles: a glicerina, o etilenoglicol e polietilenoglicol. De acordo com Sejimo, (SEJIMO,2011), a glicerina já foi empregada sem sucesso para realizar a desidratação do etanol hidratado, porém usando a técnica de destilação extrativa. Portanto considerando-se os possíveis mecanismos de adsorção química e empregando técnicas diferentes para efetuar a desidratação do álcool hidratado, a glicerina foi novamente avaliada. A metodologia empregada esta descrita no item 4.3.7. Atualmente, por utilização da infraestrutura pré-existente nas usinas, a maior parte dos produtores de etanol anidro utilizam o processo de destilação azeotrópica com ciclo-hexano, etilenoglicol e o emprego de zeólitas, (SEJIMO, 2011). Embora o emprego de zeólitas seja a tecnologia mais empregada nas usinas de processamento de álcool anidro, esta não garante a retificação do etanol obtido. Partindo deste princípio há uma preocupação em desenvolver novas metodologias para desidratação e ao mesmo tempo obter etanol com alto grau de pureza. As Figuras 23 e 24 apresentam as estruturas químicas e os possíveis mecanismos de retenção de água pelas moléculas de glicerina, etilenoglicol e polietilenoglicol.

Figura 23- Fórmulas estruturais a) etilenoglicol; b) glicerina; c) polietilenoglicol.

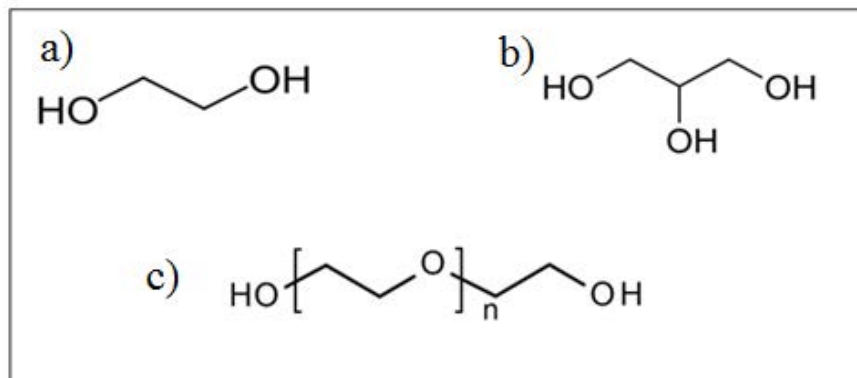
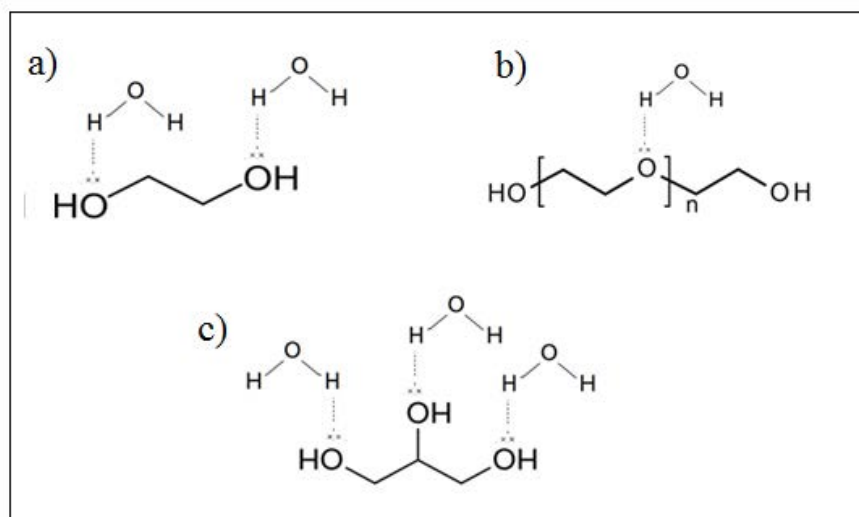


Figura 24- Interação do etilenoglicol com água (a), polietilenoglicol com água (b) e glicerina com água.



Como pode ser observado as interações químicas com as respectivas moléculas de glicerina, etilenoglicol e polietilenoglicol ocorrem por formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água presentes no álcool e com o agente desidratante. Desta forma a nova metodologia foi otimizada empregando etanol combustível, adquirido em postos de serviços. Inicialmente preparou a amostra adicionando-se 145 mL de água em um volume de 3,5 litros de etanol, garantindo a sua hidratação confirmada pela determinação do teor alcóolico, em sistema de cromatografia gasosa, cujo o valor foi de 88% (m/m) de etanol na mistura. Para fins de avaliar o perfil cromatográfico empregou-se a mesma amostra a qual foi fortificado como descrita no item 4.1.4. A Tabela 16 apresenta os níveis de concentração de etanol determinado por cromatografia gasosa, em cada fração coletada.

Tabela 16- Teor alcóolico do etanol combustível após a etapa de desidratação com polietilenoglicol, glicerina e etilenoglicol.

Teor de etanol [% (m/m)] nas frações coletadas			
Fração	Agente desidratante		
	Etilenoglicol	Polietilenoglicol	Glicerina
1	99,9	99,9	99,9
2	99,9	99,9	99,9
3	99,9	99,9	99,9
4	99,9	99,9	99,9
5	99,9	99,9	99,9
6	99,9	99,9	99,9
7	99,9	99,9	99,9
8	99,9	99,9	99,9
9	99,9	99,9	99,9
10	99,9	99,9	99,9
11	99,9	99,9	99,9
12	99,9	99,9	99,9
14	99,9	99,9	99,9
15	99,9	99,9	99,9
16	99,9	99,9	99,9
17	99,9	99,9	99,9
18	98,5	99,9	99,9
19	95,2	99,9	99,1
20	92,3	99,9	98,6

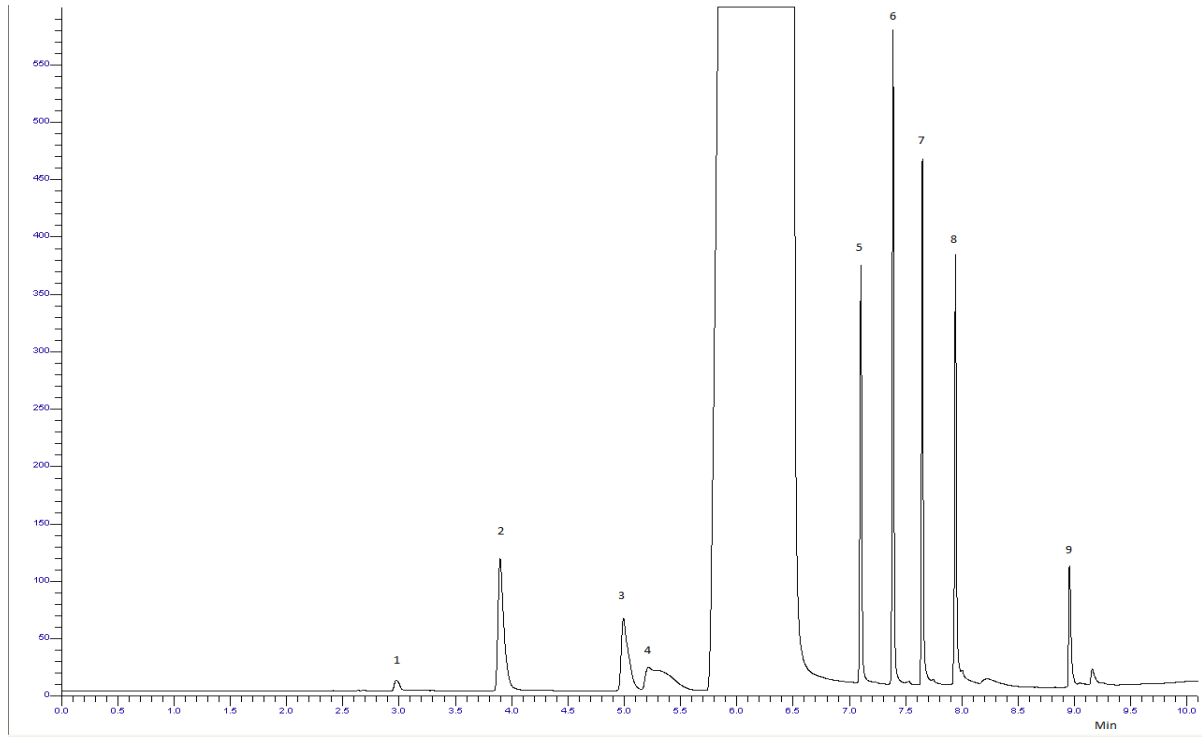
Deste modo, correlacionando a estrutura dos desidratantes, ao mecanismo de desidratação proposto e os dados obtidos experimentalmente pode-se concluir que os resultados apresentam coerência, uma vez que o menor rendimento de desidratação foi do etilenoglicol que apresenta apenas duas hidroxilas em sua estrutura. De maneira análoga tem-se a molécula de glicerina que apresenta três hidroxilas em sua estrutura interagindo por ligações de

hidrogênio com as moléculas de água o que resultaria num poder de desidratação maior do que a primeira. Com relação ao polietilenoglicol observou-se um rendimento de desidratação satisfatório, uma vez que o mesmo apresenta-se como um polímero. Mesmo sendo um polímeros, observa-se que a quantidade de átomos de oxigênio presentes em sua estrutura é muito grande permitindo que estes interajam com um número maior de moléculas de água, justificando assim o sua maior capacidade de desidratação. Comparando-se os três agentes desidratantes, o polietilenoglicol apresentou melhores resultados. É importante enfatizar que para cada 100mL do agente desidratante, (etilenoglicol, glicerina e polietilenoglicol) é possível desidratar 170, 200 e 180 mL de etanol hidratado, o que corresponde há 170, 200 e 180% (m/v) de rendimento de desidratação, respectivamente. Esta informação é extremamente importante considerando-se que no programa nacional do biodiesel foram fabricados 2,6 bilhões de litros do mesmo e 260 milhões de litros de glicerina, motivando desta forma mais uma aplicação nobre da glicerina.

5.5 Otimização de um método analítico para a determinação do perfil cromatográfico do etanol retificado

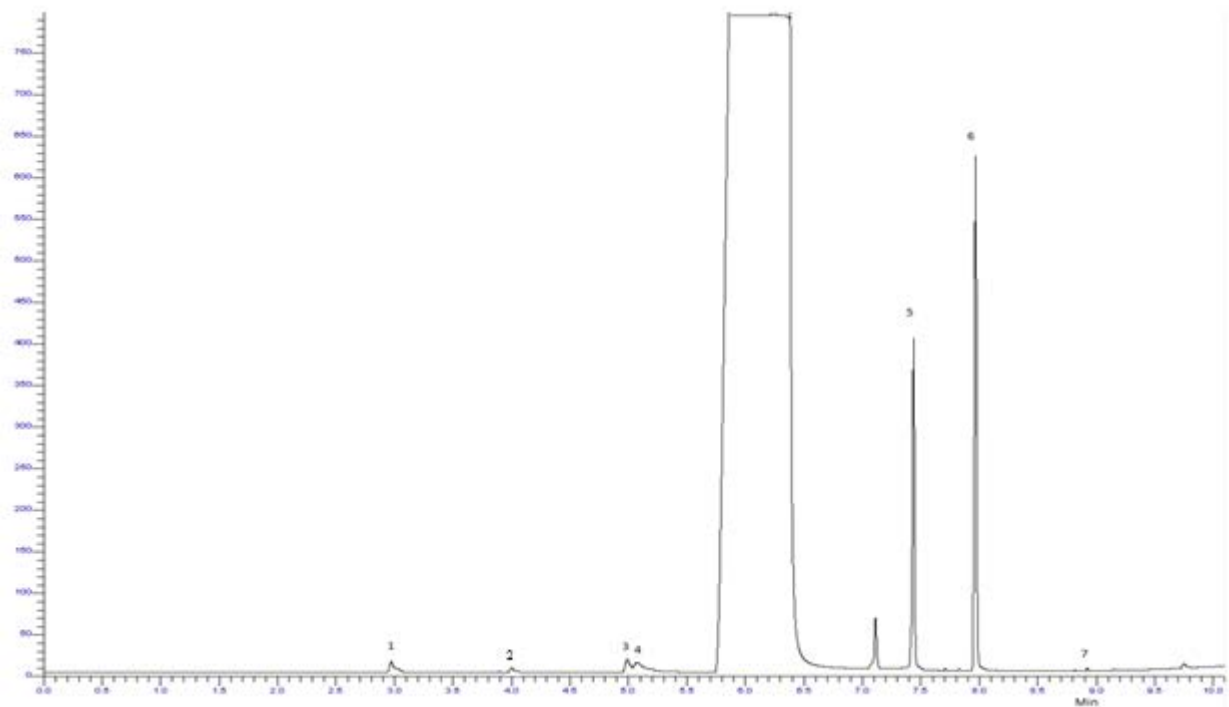
Embora a literatura especializada tem relatado vários métodos analíticos empregando o sistema de cromatografia gasosa, fez-se necessário a otimização de um método cromatográfico para efetuar as avaliações dos níveis de concentrações de vários compostos, de diferentes funções orgânicas, entre eles destacam-se o acetaldeído, acetona, acetato de etila, ácido acético e os alcóois n-butanol, isobutanol, isoamílico, metanol e propanol. Os ensaios foram realizados de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 4.3.5. Inicialmente determinou-se o tempo de retenção de cada composto, seguido pela injeção de um microlitro de uma solução-padrão contendo todos os compostos em estudo, obtendo assim a separação de cada componente presente a mistura, como pode ser visto na Figura 25.

Figura 25- Cromatograma obtido após a injeção de 1.0 μL de uma solução-padrão com níveis de concentração de 570,17 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o acetaldeído (1), e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a acetona (2), acetato de etila (3), metanol (4), n-propanol (5), isobutanol (6), n-butanol (7), isoamílico (8) e ácido acético (9), dissolvido em etanol



As condições cromatográficas ajustadas permitiu a separação de todos os componentes presentes na solução-padrão sem a presença de picos interferentes. Desta forma foi possível separar e identificar os componentes presentes em uma amostra de etanol produzido a partir do caroço da manga. A Figura 26 apresenta o cromatograma obtido após a injeção de um microlitro de etanol de caroço de manga sem retificação, no sistema de cromatografia gasosa.

Figura 26- Cromatograma obtido após a injeção de 1,0µL de etanol de manga, picos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são: acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, isobutanol, n-butanol, isoamílico e ácido acético, respectivamente.



Observou-se na Figura 24, que o pico cromatográfico do metanol apresentou uma distorção, mas esta não impediu que a sua quantificação fosse efetuada adequadamente. Acreditou-se que esta deformação se deve ao mesmo possuir uma grande interação com a fase estacionária presente na coluna cromatográfica empregada e/ou, por neste tempo de retenção a temperatura do forno estar baixa, entorno de 45 °C. Uma vez obtida com êxito a separação de todos os componentes presentes na solução-padrão, construiu-se a curva de calibração, como pode ser observada na Tabela 17.

Tabela 17- Equações das curvas analíticas obtidas para os componentes em uma solução de um padrão misto de diferentes componentes.

Componente	Curva Analítica	r ²
Acetaldeído	Y= 576,31 + 31,83X	0,9982
Acetona	Y= -10043,98 + 227,79X	0,9997
Acetato de etila	Y= -1593,29 + 143,04X	0,9997
Metanol	Y= -2486,45 + 23,71X	0,9740
n-Propanol	Y= -3082,99 + 216,35X	0,9995
Isobutanol	Y= -14012,31 + 297,34X	0,9968

Componente	Curva Analítica	r²
n-Butanol	$Y = -1358,80 + 248,47X$	0,9957
Álcool isoamílico	$Y = -20184,32 + 223,30X$	0,9888
Ácido acético	$Y = -12133,30 + 83,77X$	0,9740

De acordo com as equações das curvas analíticas e os respectivos coeficientes de correlação (r^2), apresentados na Tabela 17, permite inferir que esta metodologia mostrou-se adequada para efetuar as determinações quantitativas dos componentes presentes em amostras de álcool. Com relação à linearidade do detector, este se mostrou adequado uma vez que o coeficiente de correlação para todos os componentes estudados foram obtidos entre 0,9994 e 0,9888.

5.6 Otimização de um método para retificação do etanol hidratado.

Uma vez otimizado o método analítico empregando o sistema de cromatografia gasosa, para a determinação do perfil cromatográfico do etanol desidratado, procedeu-se as as determinações dos níveis de concentrações dos componentes presentes em amostras de álcool fortificadas. Como foi descrito e discutido no item 5.4, as mesmas amostras de etanol desidratado foram avaliadas afim de determinar o perfil cromatográfico das frações obtidas. Embora tenham sido coletadas vinte frações do destilado, apenas as frações de número dez foram injetadas no sistema de cromatografia gasosa, para se determinar os níveis de concentrações dos componentes estudados, cujos os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18- Determinação dos níveis de concentração e percentagens de eliminação dos componentes presentes em amostras de etanol combustível antes e após a retificação.

Componentes	Agentes desidratantes						
	Etanol Fortificado	Polietilenoglicol		Glicerina(%)		Etilenoglicol	
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	(%) [*] m/v	mg L ⁻¹	(%) [*] m/v	mg L ⁻¹	(%) [*] m/v
Acetaldeído	570,2	19,7	96,5	20,5	96,4	18,1	96,8
Acetona	1230,5	111,5	90,9	53,1	95,7	323,4	73,7
Acetato de Etila	1248,8	34,2	97,3	247,2	80,2	273,8	78,1
Metanol	1118,9	58,6	94,7	505,4	54,8	845,3	24,4
Propanol	1271,1	27,7	97,8	97,4	92,3	124,7	90,2
Isobutanol	911,8	30,9	96,6	7,0	99,2	7,0	99,3
Butanol	857,4	ND	100,0	19,1	97,8	22,7	97,3
Isoamílico	943,58	6,4	99,3	12,4	98,7	16,2	98,3
Ácido Acético	710,9	ND	100,0	ND	100,0	ND	100,0

*Porcentagem de eliminação dos componentes.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 18, evidencia-se que o método otimizado para a retificação do etanol combustível foi satisfatório, uma vez que foi possível reduzir consideravelmente os níveis de concentração de todos os componentes adicionados na amostra de álcool, empregando os agentes desidratantes glicerina, etilenoglicol e polietilenoglicol. Embora a glicerina tenha se mostrado eficiente no processo de desidratação do etanol, no processo de retificação do álcool não foi eficiente na eliminação do acetato de etila, metanol e butanol quando comparada os resultados com o agente desidratante polietilenoglicol. O mesmo efeito ocorreu quando se empregou o etilenoglicol. É importante lembrar que os níveis de concentração dos componentes adicionados na amostra de etanol fortificado foram relativamente altos, o que pode ocasionar a saturação dos sítios ativos dos agentes desidratantes, diminuindo a sua eficiência. Um outro fator muito importante observado durante as realizações dos ensaios foi o controle da temperatura nos balões onde estão armazenados os agentes desidratantes. Uma explicação aceitável para o mecanismo de purificação do etanol fortificado é análogo ao mecanismo da desidratação, que está relacionado ao modo como a estrutura do composto interage com as impurezas.

5.6.1 Avaliação da acidez e condutividade em amostras de etanol fortificado

A acidez e a condutividade iônica são dois parâmetros extremamente importantes a serem avaliados durante o controle de qualidade do etanol hidratado, sobretudo se for aplicado como combustíveis e/ou produção de fármacos. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos nas determinações da acidez e condutividade em amostras de etanol fortificado, antes e após o processo de desidratação e e retificação.

Tabela 19- Valores determinados para acidez e condutividade em amostras de etanol fortificado

Agente desidratante	Amostra de etanol			
	Etanol fortificado		Etanol retificado	
	Acidez (g L ⁻¹)	(μ S/m)*	Acidez (g L ⁻¹)	(μ S/m)*
Glicerina	1104	2620	36	29
Etilenoglicol	1104	2620	24	3
Polietilenoglicol	1104	2620	24	5

* Condutividade

Os valores obtidos estão em concordância com a etapa de retificação. A acidez está predominantemente relacionada à quantidade ácido acético presente na amostra, sendo assim, a acidez teve seu valor diminuído pois a etapa de retificação eliminou a concentração de ácido acético existente. A determinação da condutividade foi realizada a fim de avaliar influência da retificação para este parâmetro. O valor encontrado para o etanol combustível foi de 2620 μ S/m, como pode ser observado na Tabela 19. As principais espécies químicas responsáveis pela condutividade da amostra são alguns íons como potássio, sódio, sulfato dentre outros. Pelos dados obtidos nota-se que na etapa de retificação estes íons ficaram retidos fazendo com que sua condutividade fosse reduzida consideravelmente.

5.7 Validação da nova metodologia desenvolvida para a desidratação e retificação do etanol de manga

Após os ensaios de desidratação e retificação do etanol hidratado, empregado

como combustível, a validação da nova metodologia desenvolvida foi realizada efetuando-se os seguintes ensaios: determinação da acidez, determinação do teor alcoólico e a dos componentes presentes na amostra de etanol produzido a partir do caroço da manga antes e após o processo de desidratação e retificação empregando o polietilenoglicol como agente desidratante. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20- Determinação dos níveis de concentração e percentagens de eliminação dos componentes presentes em amostras de etanol de caroço de manga antes e após a retificação

Componentes	Agente desidratante - polietilenoglicol		
	Etanol sem retificação	Etanol retificado	
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	(%) [*] m/v
Acetaldeído	1361,4	71,1	94,8
Acetona	54,0	54,0	0,0
Acetato de Etila	227,4	145,0	36,2
Metanol	225,3	19,1	91,5
n-Propanol	460,5	134,2	70,8
Isobutanol	1565,6	227,3	85,5
n-Butanol	64,1	57,7	10,0
Isoamílico	3538,3	109,3	97,0
Ácido Acético	185,4	ND	100,0

*Percentagem de eliminação dos componentes .

De acordo com resultados apresentados na Tabela 20, observou-se a nova metodologia otimizada para desidratação e retificação do etanol hidratado, mostrou-se adequada para a desidratação e purificação do álcool produzido a partir do caroço de manga. Os níveis de concentração do acetaldeído, isobutanol e álcool isoamílico foram extremamente altos, quando determinados antes do processo de purificação. Ficou evidenciado que o agente desidratante mostrou-se muito eficiente no processo de retificação do etanol de manga, uma vez que os níveis de concentração dos componentes presentes na amostra reduziram satisfatoriamente, com relação aos componentes acetaldeído, metanol, isobutanol, álcool isoamílico e ácido acético. Com relação a acetona, acetato de etila e n-butanol não foi observado uma diminuição nos níveis de concentrações. Acredita-se que estes componentes poderiam ser eliminados caso estivesse realizado mais uma destilação fracionada antes de subter o álcool de manga ao processo de desidratação e retificação. Outros fatores podem estar relacionados ao aumento na produção destes componentes indesejáveis, durante ao processo de fermentação do álcool de manga tais como; avaliar novas cepas de leveduras, temperatura e tempo de fermentação.

As demais propriedades tais como teor alcoólico, acidez, condutividade, aspecto, etc; são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- Especificações técnicas típicas de etanol de caroço de manga

	Unidade		Quantidade	Etanol de manga *	Etanol de manga **
Massa específica	g/mL	máximo	0,8071	0,80	0,79
Grau Alcoólico	% v/v	mínimo	96,1	88,0	99,9
Acidez em ácido acético	mg/L	máximo	10	0,33	0,08
Condutividade	S/m	máximo	50	971	75
Teste de permanganato a 20°C	Minutos	mínimo	30	---	---
Absorbância	220nm	máximo	0,30	---	---
Absorbância	230nm	máximo	0,18	---	---
Acetal	mg/L		não detectável	1361,4	71,1
Acetona	mg/L		não detectável	54,0	54,0
Álcoois Superiores	mg/L	máximo	5	3538,3	109,3
Aldeídos	mg/L	máximo	5	----	----
Cronaldeídos	mg/L		não detectável	----	----
Ésteres	mg/L	máximo	5	227,4	145
Metanol	mg/L	máximo	10	225,3	19,1
Aspecto	Límpido e isento de materiais em suspensão			límpido	límpido
Teste sensorial	Livre de odores estranhos				

Adaptado (CUNHA-SALATA, 2012). * álcool sem desidratação e retificação, ** álcool desidratado e retificado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 21, observou-se uma redução acentuada na acidez e na condutividade, e o aumento acetuado no grau alcoólico comparando-se os resultados antes e após a retificação de amostras de etanol. Estes resultados estão em conformidade com as especificações técnicas para o etanol de cereais e tuberosa, relatados por Cunha-Salata, (2012).

6. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho pode-se concluir que a amêndoa do caroço de manga mostrou-se uma alternativa viável de biomassa para produção de bioetanol, com um rendimento de 275 litros por tonelada de amêndoa, assim como também permitiu o estudo da determinação de parâmetros otimizados tais como tempo de hidrólise enzimática (2 horas), volume de mosto (500 ml), massa de cepas (30g) e tempo de fermentação (48 horas).

A desidratação utilizando glicerina, polietilenoglicol e etilenoglicol, apontou como melhor agente desidratante o polietilenoglicol com uma relação agente desidratante / água 2:2 seguidos por 1:1,8 da glicerina e 1:1,7 do etilenoglicol. Embora com um rendimento inferior, a glicerina mostra-se uma alternativa viável por se tratar de um resíduo da indústria do biodiesel. No que tange ao método, o piloto desenvolvido assim como sua otimização, apresentaram-se eficientes para a proposta de desidratação, podendo ser utilizados como uma alternativa tecnológica na produção do bioetanol anidro.

A retificação mostrou reduções nos níveis de concentração das impurezas acetaldeído (94,8%), metanol (91,5%), álcool isoamílico (97,0%) e ácido acético (100%), quando feita a destilação com polietilenoglicol, além da redução em 92,3% da condutividade e 75,5% da acidez, para o álcool produzido a partir do caroço de manga.

Com a metodologia proposta foi possível a produção do bioetanol, sua desidratação e retificação atingindo um perfil muito próximo a de um etanol neutro, que é considerado o mais puro. Como proposta futura, novos estudos no que tange a retificação serão desenvolvidos no intuito de aumentar ainda mais o rendimento da etapa de retificação.

7. REFERÊNCIAS

ALESSI, V.F. **Álcool: a vantagem continua.** Revista Quatro Rodas. São Paulo, ano XXV, v.289, p. 89-92,2004.

AOAC- Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.** 16.ed. Arlington: Washington, v. 1-2, 1997.

AROGBA, S. S. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. **Bioresource Technology.** Nigeria. 70, 277-281, 1999.

BIGONHA, S. M. **Efeito da utilização de farelo de resíduos de manga em rações sobre os parâmetros ósseos de frangos de corte.** 2009. 54f. Dissertação (Pós-graduação em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2009.

BOLLÓK, M. **Studies on ethanol production on lignocellulosics: SSF and cellulase production.** Tese de doutoramento. Department of Agricultural and Chemical Technology. Technical University of Budapest, Hungary, 1999.

BRINGHETI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia e Agricultura,** Botucatu, vol. 20, n.4, p 36-52, 2005.

CAMARGO-FILHO, W. P.; ALVES, S. H.; MAZZEI, A. R. MERCADO DE MANGA DO BRASIL: contexto mundial, variedades e estacionalidade. **Informações Econômicas,** São Paulo, v.34, n.5, maio 2004.

CAVALCANTI, M. T.; ALMEIDA, M. C. B. M.; DEODATO, J. N.; S. ARAUJO, A. **Caracterização físico-química da amêndoa do caroço da manga Tommy Atkins.** In: I Semana Acadêmica da Engenharia de Alimentos de Pombal, 2011.

CAVALCANTI, M. T.; SILVA, V. C.; COSTA, T. S.; FLORENCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R. Obtenção do amido do endocarpo da manga para diversificação produtiva na indústria de alimentos. *Revista Verde*, v.6, n.5, p. 80-83, 2011.

CORDEIRO, E. M. S.; MAGALHAES, C. P.; SOUZA-FILHO, M. S. M.; ROSA, M.F; ITO, E. N. **Obtenção e caracterização de nanocelulose e amido a partir do caroço da manga visando a produção de bionanocompósitos poliméricos.** In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, Florianópolis, 2013.

CORRÊA, C. L.; PEDROSO, R. C. Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 365-368, 1997.

COUTO-FILHO, C. C. C.; NEIVA-JUNIOR, A. P.; FREITAS, R. T. F.; SOUZA, R. N.; NUNES, J. A. R. Qualidade da silagem de resíduo de manga com diferentes aditivos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1537-1544, 2007.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. S. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amostras termoplásticas derivadas do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p.268-273, 2005.

CRUZ, S. F. **Síntese e caracterização da metilcelulose produzida a partir do caroço de manga para a aplicação como aditivo em argamassa.** 2011. 114f. Tese (Pós-graduação em Química) Instituto de Químico, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

CUNHA-SALATA, C. **Sistemas de purificação de bioetanol para mini destilarias de mandioca,** 2012. 198f. Tese (Pós-graduação em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

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

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A.; Enzymatic determination of starch in doce de leite using dialysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(3): 339-342, 2001.

FIGUEIREDO-OLIVEIRA, E. M. **Processo de desidratação do álcool**, 2010. 47f. Monografia (Engenharia Química)- Universidade Estadual de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FLORÊNCIO, I. M.; SOUZA, M. S. R.; GONDIM, S. S. R.; CAVALCANTI, M. T.; FLORENTINO, E. R. **Farinha do caroço da manga como ingrediente na elaboração de produtos de panificação**. In: Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB, Campina Grande, 2012.

FUJI, M. , HOMMA, R. TANIGUCHI, M, Synergism of α -amylase and glucomylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnology and Bioengineer**, v.32, p.910-915 1988.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de Benzeno, Tolueno e Xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, p. 176-179, 2001.

JUNIOR, R. J. S. M., **Obtenção do álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo: validação de um processo em batelada**.2010. 159f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química), Santa Maria, RS, 2010.

KITTIPHOM, S. Utilization of mango seed. **International Food Research Journal**, Thailand, 19(4): 1325-1335, 2012.

KOLB, B. Headspace sampling with capillary columns. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 163-205, 1999.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Carlos-SP: Acta, 1993. 254p.

LIMA, A. M. **Estudos recentes e perspectivas da viabilidade técnico – econômica da produção de etanol lignocelulósico**. 1 ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. 10 p. Disponível em:
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/890268/1/CITE05.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

LIMA, M. R.; LUDKE, M C. M. M.; NETO, F. F. P.; PINTO, B. W. C; TORRES, T. R.; SOUZA, E. J. O. Farelo de resíduo de manga para tilápias do Nilo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 65-71, 2011.

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

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. Cromatografia com fase gasosa. In: **Análise Química Quantitativa**. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. P. 160-173.

MONNA, M., et al **Starch Stärke**, v.41 , p.382-385, 1989.

NAIK, S. B.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production on first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, p. 518-597, 2010.

PAVLAK, M. C. M. Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 7-24, 2007.

PIMENTEL, I. C. **Enzimas aminolíticas e proteolíticas**. Piracicaba: Departamento de genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”-USP, p.52. 1987

PONTES, M. M. M. **Polpa de Manga Processada por Alta Pressão Hidrostática: Aspectos Microbiológicos, Nutricionais, Sensoriais e a percepção do Consumidor**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

RIBEIRO, E.J.A. Apresentação Destilação: Álcool Anidro e Hidratado, 2007.

RIZATO, M. Potencial Econômico da produção de álcool de mandioca no norte do Brasil. Artigo apresentado no XIII Congresso Brasileiro da Mandioca, 2009.

ROCHA, L. G. **Dossiê Técnico sobre o aproveitamento de resíduos agroindustriais**. Minas Gerais: CETEC, 2011. 30p.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841-845.

SEJIMO, W. N. **Obtenção do álcool anidro**, 2011. 43f. Monografia (Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2011.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**, 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SNOW, N. H.; SLACK, G. C. Head-space analysis in modern gas chromatography. **Trends in Analysis Chemistry**, v. 21, p. 608-617, 2002.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Hidrólise do amido. Campinas: Fundação Cargill. 377p. 2002.

TRINDADE-FILHO, J. C. Produção de amostra de amido catiônico e realizar teste de floculação. In: IV Encontro de Produção Científica e Tecnológica, Campo Mourão, 2013.

VASCONCELOS-TORRES, L. B. **Qualidade e conservação pós-colheita de mangas oriundas de sistemas de produção orgânica integrada**. 2010. 214f. Tese (Pós-graduação em Agronomia) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

VIEIRA, P. A. F. et al. Caracterização química do resíduo do processamento agroindustrial da manga (*Mangifera Indica*) Var Ubá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.4, p. 617-623, 2009.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.974-980, 2005.