

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**QUALIDADE DO ÁLCOOL PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS AMILÁCEOS
DA AGROINDUSTRIALIZAÇÃO DA MANDIOCA**

LIZANDRA BRINGHENTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

**BOTUCATU-SP
Dezembro - 2004**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**QUALIDADE DO ÁLCOOL PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS AMILÁCEOS
DA AGROINDUSTRIALIZAÇÃO DA MANDIOCA**

LIZANDRA BRINGHENTI

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Cabello

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Dezembro - 2004

DEDICO

Ao Mestre dos Mestres.

À minha família que sempre apoiou e respeitou minhas decisões mesmo em momentos de divergência. A eles, precursores dos meus princípios de justiça, honestidade e honra, dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Jamais serei completamente grata a essas pessoas. Independente do que já foi dito ou possa vir a ser, palavras faltarão...

Aos meus avós Armelindo e Cecília Tocchetto, pelo apoio incondicional na concretização deste projeto de vida e acima de tudo pelos exemplos de vida, dignidade, amor e respeito.

Aos meus pais Domingos e Soeli Bringhenti, pelo apoio e exemplo, e mais ainda pela compreensão de minha ausência física em tantos momentos especiais.

Ao meu amado tio, Armelindo Tocchetto Filho, pelo apoio e ajuda em tantas horas difíceis...

Aos meus tios, tias e agregados que colaboraram durante toda esta jornada.

Aos meus irmãos Alexandre e Lisiane, aos cunhados Aline e Ricardo, minhas sobrinhas Andressa, Natália e Laura, pela importância dos laços familiares.

À prima, mas irmã de coração, Juliana Tocchetto Schuch, por tantas alegrias, companheirismo e carinho.

À amiga, professora, mãe e irmã mais velha Ewelín Canizares, pelo auxílio em tantas etapas, mas principalmente pelo incentivo na carreira acadêmica.

Ao meu orientador Cláudio Cabello, pelo profundo sentimento humano, amizade, empenho e dedicação.

Aos professores Magali Leonel e Marcelo Oliveira, e todos os funcionários e colegas do CERAT, pela colaboração prestada ao longo deste trabalho.

Aos professores e incentivadores Marco Ferrão e Valeriano Corbellini.

Aos meus amigos Alex Motta, Denise Scherer, Juliana Panhozzi, Maria Goreti Carmargo, Wagner Batista, pela amizade, carinho e compreensão.

À Fábrica de Farinha de Mandioca Plaza e a Usina de Açúcar da Barra pelos resíduos fornecidos.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa.

Peço desculpas às pessoas não citadas, mas tenham certeza que esta ausência se restringe apenas a esta folha.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	11
SUMMARY.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Álcool etílico.....	17
2.2 Mandioca.....	18
2.3 Processo de fabricação de farinha de mandioca.....	20
2.4 Produção de álcool etílico a partir do amido decantado.....	24
2.4.1 Processo de hidrólise e sacarificação de amido.....	24
2.4.2 Enzimas amilolíticas.....	27
2.4.3 Fermentação alcoólica.....	29
2.4.3.1 Levedura	29
2.4.3.2 Necessidades nutricionais.....	30
2.4.3.3 Melaço	31
2.4.3.4 Equação de Gay-Lussac	31
2.4.3.5 Processo Biostil.....	32
2.4.3.6 Fatores que interferem na fermentação.....	33
2.4.4 Destilação.....	33
2.5 Etanol produzido a partir de fontes amiláceas.....	34
2.6 Componentes.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38

3.1 Resíduo amiláceo.....	38
3.2 Resíduo da fabricação de açúcar de cana.....	38
3.3 Caracterização do substrato.....	38
3.4 Ensaio de avaliação do hidrolisado.....	39
3.4.1 Preparação e padronização.....	39
3.4.2 Preparo do substrato.....	39
3.4.3 Hidrólise e sacarificação.....	39
3.5 Ensaio de fermentação.....	40
3.5.1 Levedura.....	40
3.5.1.1 Multiplicação de levedura utilizada no ensaio.....	40
3.5.1.2 Pé de cuba.....	40
3.5.2 Ensaio fermentativo.....	41
3.5.3 Processo de fermentação tipo batelada.....	41
3.6 Destilação do vinho.....	42
3.6.1 Retificação do destilado.....	42
3.7 Análises para caracterização dos materiais.....	44
3.7.1 Concentração de carboidratos e álcoois	44
3.7.2 Preparação dos derivados carboxílicos das 2,4-DNPH.....	44
3.7.3 Procedimento analítico.....	45
3.7.4 Teste de Barbet.....	45
3.8 Processo piloto.....	45
4 DISCUSSÃO E RESULTADOS.....	47
4.1 Caracterização do substrato.....	47
4.1.1 Melaço.....	47
4.1.2 Amido decantado.....	48

4.2. Ensaio para avaliação do substrato.....	49
4.2.1 Tratamento no substrato.....	49
4.2.2 Ensaio fermentação	51
4.3 Produção de etanol.....	53
4.3.1 Índices do processo.....	54
4.3.2 Concentração de aldeídos e ácidos orgânicos.....	54
4.3.3 Perfil cromatográfico da concentração de álcoois.....	56
4.4 Processo Piloto.....	56
4.4.1 Resultados dos ensaios piloto.....	56
4.4.1.1 Crescimento celular e consumo de substrato.....	57
4.4.1.2 Fermentação.....	58
4.4.1.3 Destilação.....	60
4.5 Álcool etílico de resíduo amiláceo.....	61
4.6 Balanço de massas.....	64
5 CONCLUSÕES.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Características oficiais do álcool etílico hidratado adotadas pelo IAA.....	18
Tabela 2 – Resíduo do processamento de mandioca em agroindústrias instaladas no município de Ubirajara/SP. (em toneladas).....	23
Tabela 3 – Tabela com os valores das análises centesimais efetuadas nos resíduos.....	23
Tabela 4 – Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.....	30
Tabela 5 – Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter uma fermentação alcoólica adequada.....	31
Tabela 6 – Valores médios das análises centesimais realizadas no mel residuário e valores correspondentes observado na literatura indicada.....	47
Tabela 7 – Valores médios das análises centesimais realizadas no mel residuário e valores correspondentes observado na literatura indicada.....	48
Tabela 8 – Valores de concentração de açúcares redutores totais antes e depois do tratamento enzimático nas soluções de composição indicada.....	52
Tabela 9 – Consumo percentual dos açúcares redutores totais nas fermentações ensaiadas.....	52
Tabela 10 – Resultados da produção de etanol durante a fermentação nas soluções testadas (%) no tempo de 26h.....	54
Tabela 11 – Identificação e concentração dos aldeídos verificados nas amostras de etanol coletadas durante ensaio prospectivo de fermentação.....	55
Tabela 12 – Concentrações de etanol, metanol e glicerol presentes nas seis alíquotas retiradas no processo.....	56
Tabela 13 - Crescimento de massa celular e consumo de açúcares redutores totais no processo piloto de fermentação.....	57
Tabela 14 – Perfis da concentração de etanol, glicerol e açúcares redutores produzidos na fermentação em função do tempo.....	59

Tabela 15 – Valores médios dos aldeídos identificados e quantificados nas alíquotas obtidas em g/L.....	60
Tabela 16 – Aldeídos identificados e quantificados em amostras de álcool etílico produzido no piloto de ensaio, álcool etílico de cereais, álcool etílico PA e álcool etílico comercial.....	62
Tabela 17 – Aldeídos identificados e quantificados em amostra do produto obtido após processo de retificação.....	62
Tabela 18 - Comparativo entre as exigências do consumidor para álcool etílico de uso farmacêutico com os resultados dos álcoois etílicos de cereais e de resíduo amiláceo.....	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Fluxograma do processamento de uma fábrica de farinha de mandioca.....	22
Figura 2 - Fluxograma com o processo de produção de hidrolisado pelo método ácido-enzima.....	25
Figura 3 - Fluxograma do processo de produção de hidrolisado pelo método enzima-enzima.....	27
Figura 4 - Coluna de destilação utilizada no projeto.....	43
Figura 5 – Diagrama indicativo das etapas do processo fermentativo piloto realizado....	46
Figura 6 – Concentração de açúcares redutores das amostras de melaço antes e depois do tratamento.....	49
Figura 7 – Perfil dos sacarídeos no melaço antes e depois do tratamento enzimático para hidrolise do substrato.....	50
Figura 8 – Valores das concentrações de AR antes e depois do tratamento enzimático nas formulações utilizadas nos ensaios prospectivos.....	51
Figura 9 – Gráficos mostrando os perfis de consumo dos açúcares redutores totais das formulações durante o processo de fermentação.....	52
Figura 10 – Perfis de produção de etanol nas fermentações com substratos hidrolisados e compostos com melaço.....	53
Figura 11 – Perfil do crescimento de massa celular e correspondente consumo de açúcares fermentescíveis em função do tempo de fermentação.....	58
Figura 12 – Perfis da produção de etanol, glicerol e consumo de açúcares redutores em função do tempo.....	59
Figura 13 - Diagrama indicativo do balanço de massas do processo piloto.....	64

RESUMO

Neste trabalho fez-se uma avaliação da utilização dos resíduos da agroindustrialização da mandioca como fonte de carbono para fermentação alcoólica, buscando um etanol, que possua qualidades adequadas para uso na indústria alimentícia. No sentido de promover uma alternativa viável, tanto tecnologicamente como economicamente, traçou-se um planejamento experimental que minimizasse os custos. Preocupou-se também, com a sustentabilidade ambiental do processo, pois a produção de álcool etílico pelo método aqui proposto, acena como uma alternativa para que o resíduo gerado, na indústria da mandioca, passe ao status de co-produto, gerando para a indústria não só receita como todos os benefícios mercadológicos de uma indústria limpa.

O resíduo utilizado foi o amiláceo pré-hidrolizado que após o processo de fermentação foi destilado e teve seu produto separado e analisado. Desenvolveu-se uma coluna de destilação com recheio de vidro, para operação contínua a fim de estabelecer uma planta pré-piloto, onde ocorram os processos de hidrólise, fermentação e destilação. O substrato escolhido foi submetido a diversos ensaios e, o etanol obtido foi avaliado utilizando metodologias analíticas de derivatização.

Para suprir as leveduras alcoólicas dos requisitos nutricionais necessários à sua manutenção durante o processo de fermentação, adicionou-se concentrações crescentes de mel residuário de sacarose aos substratos amiláceos previamente hidrolisados, nas proporções de 5, 10, 15 e 20% . Estas soluções foram padronizadas buscando manter a mesma concentração de carbono orgânico e na etapa subsequente foram tratadas com enzimas

amilolíticas para sacarificação completa. Após o inóculo com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, as fermentações foram monitoradas e observou-se que os melhores resultados foram: obtidos com mel residuário na concentração de 20%, resultando na produção de 47,42% de etanol, a partir de um consumo de 56,3% do ART. O tempo de fermentação ótima foi de 26 horas.

No destilado final, observou-se ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol, e ácidos carboxílicos. Dentre os aldeídos identificados estão o furfuraldeído e o formaldeído com concentrações de 0,01 e 0,004 g/L respectivamente.

O álcool de resíduo amiláceo apresentou concentração isotópica de 97% do tipo C3 e outros 3% do tipo C4 indicando que não houve uma proporcionalidade de conversão do carbono contido no mel residuário do substrato (20%) em etanol.

A utilização dos resíduos da agroindustrialização da mandioca como fonte de carbono para fermentação alcoólica, avaliada neste trabalho mostrou-se adequada na produção de um etanol com qualidades requeridas para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.

ETHIL ALCOHOL QUALITY PRODUCED FROM AMYLACEOUS RESIDUES OF CASSAVA INDUSTRIALIZATION

Botucatu, 2004. 72 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author : LIZANDRA BRINGHENTI

Adviser: CLAUDIO CABELLO

SUMMARY

In this study an evaluation of the residue from the agricultural industrialization of cassava root is aimed. The main goal of this evaluation was towards the potential use of the root as a carbon source to the ethanol production via fermentation. The ethanol obtained must have characteristics good enough to be used in the food industry.

Keeping in mind that, nowadays, industrial process must be sustainable and also economically feasible, an experimental scheme was designed. If the second goal may be proved, the first one appears immediately; due to promote an alternative use for a residue that otherwise may impact the environment.

The experiment begins with the pre-hydrolysed amylaceous that is a by-product from the production of cassava flour. This starch was submitted to fermentation under

optimized conditions, the wine resultant went through distillation, the final product was separated and analysed.

A distillation column, containing glass pearls, was designed in order to integrate a pilot project that may work in a process of continuous operation. This pilot plant was designed in order to achieve the process of hydrolysis, fermentation and distillation. The chosen substrate was then submitted to various tests at diverse conditions and the ethanol obtained was evaluated through analytical methods with derivatization.

In order to optimize the fermentation process by giving to the yeast better conditions of development, molasses, from the sucrose production, was added. The additions were of 5, 10, 15 and 20 %. These solutions were standardized in order to keep the same organic carbon content and after this were submitted to a treatment with amylolytic enzymes. This treatment goal was to promote a complete saccharification.

The yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, was introduced and the fermentation process was monitored. The best results were obtained at a molasses concentration of 20 %, where the production of ethanol was of 47,42%, with a consumption of 56,3 m % of the sugar. The process optimal time was of 26 hours.

The final product showed no presence of high molecular weight alcohols, methanol, glycerol, or carboxylic acids. Some aldehydes were found, instead, among them, the furfuraldehyde and the formaldehyde, at the concentrations of 0.01 and 0.004 mg/L, respectively.

The isotopic concentration in the final product was of 97 % of C3, and 3% of C4. These data shows that the conversion of the carbon contained in the molasses was not proportional to its concentration.

By the obtained data we conclude that use the residue from the agricultural industrialization of cassava as carbon source to the alcohol production is viable, and the result ethanol has good qualities, being able to be introduced in the food and pharmaceutical industry.

Key words: Ethanol production, fermentation, hydrolysis, molasses.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, com 24,5 milhões de toneladas/ano, é o segundo produtor mundial de mandioca, sendo que a Nigéria lidera a produção, com 32,5 milhões de toneladas. Na seqüência, pela ordem, os outros países que mais produzem são Congo 18,5 milhões de toneladas, Tailândia 18 milhões de toneladas e Indonésia 16 milhões de toneladas. (DANDÃO,2003)

O sistema produtivo da cadeia da mandioca se apresenta de modo diversificado no Brasil devido a fatores culturais e econômicos, mas pode-se classificar basicamente em três tipos; unidade doméstica, unidade familiar e unidade empresarial. As duas primeiras não manipulam volumes mássicos significativos de raízes de mandioca para produzir fécula de mandioca, interagindo com os sistemas locais para a sua sobrevivência. Em todas elas são gerados resíduos que devido a presença de amidos, apresentam significativa carga poluidora e, portanto, requerendo um manejo adequado.

As agroindústrias que fabricam farinha de mandioca apresentam variados níveis tecnológicos em seus processos produtivos que se refletem tanto na qualidade do produto como no resíduo gerado. Segundo Del Bianchi (1998), para cada tonelada de raízes de mandioca processada, em peso seco, obtém-se 731 – 796 kg de farinha, com 89% de amido, e 14% de umidade. Gera também em torno de 102 - 153 kg de resíduo sólido com cerca de 67% de amido e resíduos líquidos como a água de lavagem das raízes e a manipueira.

A água de prensa ou manipueira é, segundo Normanha (1982), o suco ou água de constituição das raízes, removida por prensagem das raízes frescas, picadas ou da

massa ralada da indústria da farinha. Em sua composição há uma porcentagem dos diferentes constituintes das raízes, tais como amido, sais minerais, proteínas e os glicosídeos cianogênicos.

Normalmente, no processo de fabricação da farinha, a manipueira passa por um leito de baixa velocidade denominado labirinto, onde ao longo do trajeto deposita os componentes sólidos sendo que o amido residual aparece em maior quantidade e o sobrenadante segue para lagoas de deposição. O resíduo sólido decantado é constantemente retirado das canaletas do labirinto e depositado no meio ambiente sem tratamento, sendo posteriormente incorporado ao solo. Este resíduo sólido é constituído praticamente de amido contaminado com outros compostos químicos da mandioca, apresentando potencialidades de utilização.

A produção de álcool etílico a partir dos resíduos da indústria da mandioca acena como uma alternativa para transformar o resíduo amiláceo em co-produto, gerando para a indústria não só receita como todos os benefícios mercadológicos de uma indústria limpa.

Este amido não é disponível à levedura alcoólica e necessita de uma transformação à mono e dissacarídeos fermentescíveis, que pode ser realizada utilizando amilases como catalizadores no processo de hidrólise. Esta etapa é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos à fermentação.

Quimicamente, o álcool etílico hidratado não apresenta diferenças quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o etanol, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986). Dentre estas características, destaca-se a identificação de isótopos utilizada inclusive para elucidação de fraudes em bebidas.

O presente trabalho propõe um processo otimizado, para a produção de álcool de qualidade, adequado para utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, utilizando resíduo do processo da agroindustrialização da mandioca e aditivado com mel residuário da cana-de-açúcar, quais sejam amido decantado lixiviado pela água residuária de fécula e farinheiras e também de mel residuário do processo de produção de sacarose em usinas de açúcar de cana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Álcool etílico

A tecnologia de produção de álcool nos permite basicamente a existência de duas classes de produto; i) álcool etílico hidratado, e , ii) álcool etílico anidro ou absoluto, cujas especificações, são definidas segundo as aplicações a que é destinado. Como todo produto, o álcool etílico pode conter alguma substância residual de onde foi extraído, advindo daí a necessidade de purificá-lo ao grau necessário a sua aplicação, entendendo-se então que quanto mais nobre seja a aplicação mais requisitos de qualidade são aplicáveis.

A legislação brasileira não define especificações para o álcool etílico, e , um acordo no mercado de compra e venda define, conforme a sua utilização quais características devem possuir. De maneira informal, permanece vigente as características oficiais que eram adotadas pelo Instituto de Açúcar e Álcool, extinto em 1990.

Na Tabela 1 temos as especificações para álcool etílico bruto, álcool etílico retificado, álcool etílico retificado fino e álcool etílico retificado extra-fino , segundo o IAA.

O álcool etílico hidratado é utilizado em várias aplicações, sendo as mais comuns o chamado uso potável, alimentício e farmacêutico: fabricação de bebidas (vodka, gim, licores, etc.), fabricação de vinagre, fabricação de alimentos (precipitante, solvente, etc.), solvente de aromas (aromatizante) na fabricação de alimentos e cigarros, na extração de produtos medicinais de plantas e tecidos animais, na fabricação de vacinas, antibióticos e preparações em geral, antisséptico, etc.; Em cosméticos; para fabricação de perfumes,

desodorantes, cremes, produtos de toalete em geral, etc. Ou ainda em usos menos nobres como o industrial; fabricação de detergentes; produtos de limpeza; tinturas; têxteis; pinturas; solventes; combustível; aplicações especiais, etc.

Tabela 1 – Características oficiais do álcool etílico hidratado adotadas pelo IAA.

	Álcool bruto	Álcool Retificado	Álcool Retificado fino	Álcool Retificado Extrafino
Peso específico a 20 °C - mínimo	0,822g/mL	0,8112g/mL	0,8074g/mL	0,8073g/mL
Grau em peso INPM	88,4	92,5	92,9	92,9
Porcentagem em volume a 15 °C	92	95	96	96
Acidez máxima	20mg/100mL	3,0mg/100mL	1,8mg/100mL	0,5mg/100mL
Ésteres máximo	–	3,6mg/100mL	–	–
Reação de Barbet - mínimo	–	2,0 minutos	10,0 minutos	15minutos

Tabela 1. Valores e terminologias adotados pelo IAA, para álcool etílico hidratado. (RASOVSKY,1973)

2.2 Mandioca

A raiz de mandioca " in natura " é um produto agrícola altamente perecível, cuja utilização como alimento é indicada dentro de 1 a 3 dias depois de colhida. Entretanto, as raízes de mandioca são matéria-prima para alguns produtos de transformação, que permitem seu uso por longo tempo como alimento ou ingredientes/aditivos para outras aplicações. Com ela podem ser produzidos farinha, fécula ou polvilho doce, fécula fermentada ou polvilho azedo, raspas, farinhas de raspas, "pellets", tapioca, flocos, álcool, acetonas, álcool butírico, etc. A composição varia de acordo com a idade da raiz e com o cultivar. Eliminando-se a película parda e considerando a parte central e a casca branca como um todo, pode-se admitir a seguinte composição química centesimal da mandioca: 65-75% de água, 2-5% de proteína bruta, 1,5-2,5% de celulose, 0,1-0,5% de matéria graxa, 18-23% de fécula e 0,5-1,9 de cinzas. (LIMA, 1982)

A fécula é substância de reserva das raízes de mandioca que são acumuladas com teores médios de 20-30 %, variando entre os limites de 13% a 35%. Considerando-se que as raízes colhidas apresentam teores de umidade de 60 a 75%, o amido na matéria seca pode se concentrar até cerca de 90%.(VILLELLA; FERREIRA, 1987)

Fécula e amido são sinônimos do ponto de vista da composição química, entretanto, a legislação brasileira considera amido a substância amilácea encontrada nos órgãos aéreos vegetais e fécula a encontrada nas raízes e tubérculos. (LEONEL, 1998).

O amido isolado dos vegetais é composto essencialmente por polímeros de α -D-glucose, mas também podem apresentar compostos menores provenientes de diversas fontes. Os polímeros formadores do grânulo de amido são a amilose, polissacarídeo linear de (1 \rightarrow 4)- α -D-glucose e a amilopectina, molécula ramificada, onde cadeias de (1 \rightarrow 4)- α -D-glucana são conectadas por ligações α (1 \rightarrow 6). O amido deve muito de sua funcionalidade a estas duas macromoléculas, assim como a organização física das mesmas dentro da estrutura granular (BILIADERIS, 1991).

As características dos amidos dependem da planta onde foi produzido e estocado e, para efeitos de sistematização de estudos, subdividiu-se em dois grupos; os originários de cereais e os outros de raízes. O armazenamento sob a forma de grânulos nas plantas e reaproveitamento da energia pela ação de enzimas é um mecanismo altamente favorável, pois à noite ocorre a utilização dos açúcares resultantes das hidrólises para a manutenção da planta. (LEONEL, 1998)

Nas células vegetais, os grânulos são formados dentro de estruturas especiais denominadas amiloplastos envolvidos por uma matriz protéica denominada estroma. Ao microscópio ótico o grânulo de amido mostra ser constituído de uma massa homogênea mas por análise comparativa a outros nota-se variações no formato, tamanho, simetria, etc. Quando ao tamanho e a forma estes são característicos da planta de origem e no geral os grânulos de amido possuem diâmetro que variam na faixa de 1 a 100 μ m sendo que os originários de cereais possuem menores diâmetros e maior concentração de proteínas e lipídios.

Os amidos provenientes de mandioca são redondos, ovais, poligonais e cilíndricos de acordo com Richard et al. (1991) e foram observados tamanhos de grânulos de

5 a 35 μm com a média de 20 μm . A densidade é também característica importante principalmente para os processos de extração pois as velocidades de decantação são de valia para as separações e foram observados valores para fécula de mandioca a 30°C de 1,4857g/mL (CIACCO; D'APPOLONIA, 1977). Os amidos são insolúveis em água com temperaturas inferiores a 50°C.

O amido é fonte de carbono em muitos processos fermentativos inclusive na produção de etanol para fins industriais. Porém este não é assimilado diretamente pelas leveduras, sendo necessária uma hidrólise e posterior sacarificação desta matéria-prima, para obtenção de glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis pelo microorganismo.

Os amidos extraídos da mandioca apresentam pequenas concentrações de matérias graxas e proteínas em relação a outros extraídos de milho, batata e, conseqüentemente o seu hidrolisado apresenta-se com altas concentrações de carboidratos, mas necessita ser aditivado com outros materiais para torná-lo adequado à fermentação alcoólica.

O mel residual originário de usina de fabricação de açúcar de cana possui oligoelementos, vitaminas, precursores, entre outros, que tornam este material de baixo custo interessante como aditivo. Aliado a isso, experimentos realizados por Najafpour E Shan (2003), demonstraram um aumento da quantidade de açúcares fermentescíveis quando este mel residuário era submetido a tratamento com enzimas amilolíticas, ou seja, os amidos originários da cana de açúcar ainda remanesciam no material e o tratamento os solubilizou.

2.3 Processo de fabricação de farinha de mandioca

Durante o processo de produção de farinha de mandioca, na etapa de prensagem da massa ralada, é gerado um resíduo líquido denominado manipueira. A manipueira, ou água de constituição da raiz da mandioca carrega a maioria dos sólidos solúveis, parte do amido e o cianeto. Segundo Cereda (2001), a manipueira gerada nas farinheiras contém em média 8,74% de amido e cerca de 90,77% de umidade.

Alguns relatos sobre o balanço de massa em farinheiras podem ser encontrados na literatura, embora indiquem a metodologia da quantificação dos materiais

obtidos em cada etapa do processo. Na figura 1 temos um fluxograma do processamento de uma fábrica de farinha de mandioca.

Takahashi E Fagiotto (1992) realizaram um balanço de massa durante cinco dias em uma farinheira de Paranaíba-PR. A variedade utilizada foi a “Fibra”, colhida 17 meses após o plantio. De acordo com as características da empresa, os seguintes dados médios de quantidade foram obtidos, por tonelada processada de raízes: cepa – 2,16 kg (0,2%), casca e entrecasca – 51,10 kg (5,1%), manipueira – 468,84 litros (46,9%), crueira (ou carolo) – 2,12 kg (0,2%), bagacinho (ou fibra) – 2,12 kg (0,2%), farinha – 259,43 kg (25,9%).

Considerando os dados da Cetesb (1994), em uma farinheira que processe em torno de 30 toneladas de raízes de mandioca/dia, são perdidos 150 kg de polvilho (fécula) residual, o que poderia ser aproveitado na produção de etanol. Isso transformaria um resíduo em co-produto, gerando receita para a empresa, além de diminuir a carga orgânica do resíduo líquido.

Cabello et al. (2002) quantificaram e qualificaram resíduos amiláceos produzidos por quatro agroindústrias de processamento de mandioca, três fábricas de farinha e uma fábrica de mandioca pré-cozida e congelada, em uma micro-região do estado de São Paulo, num raio de 3 Km e observaram os valores expressos nas Tabelas 2 e 3.

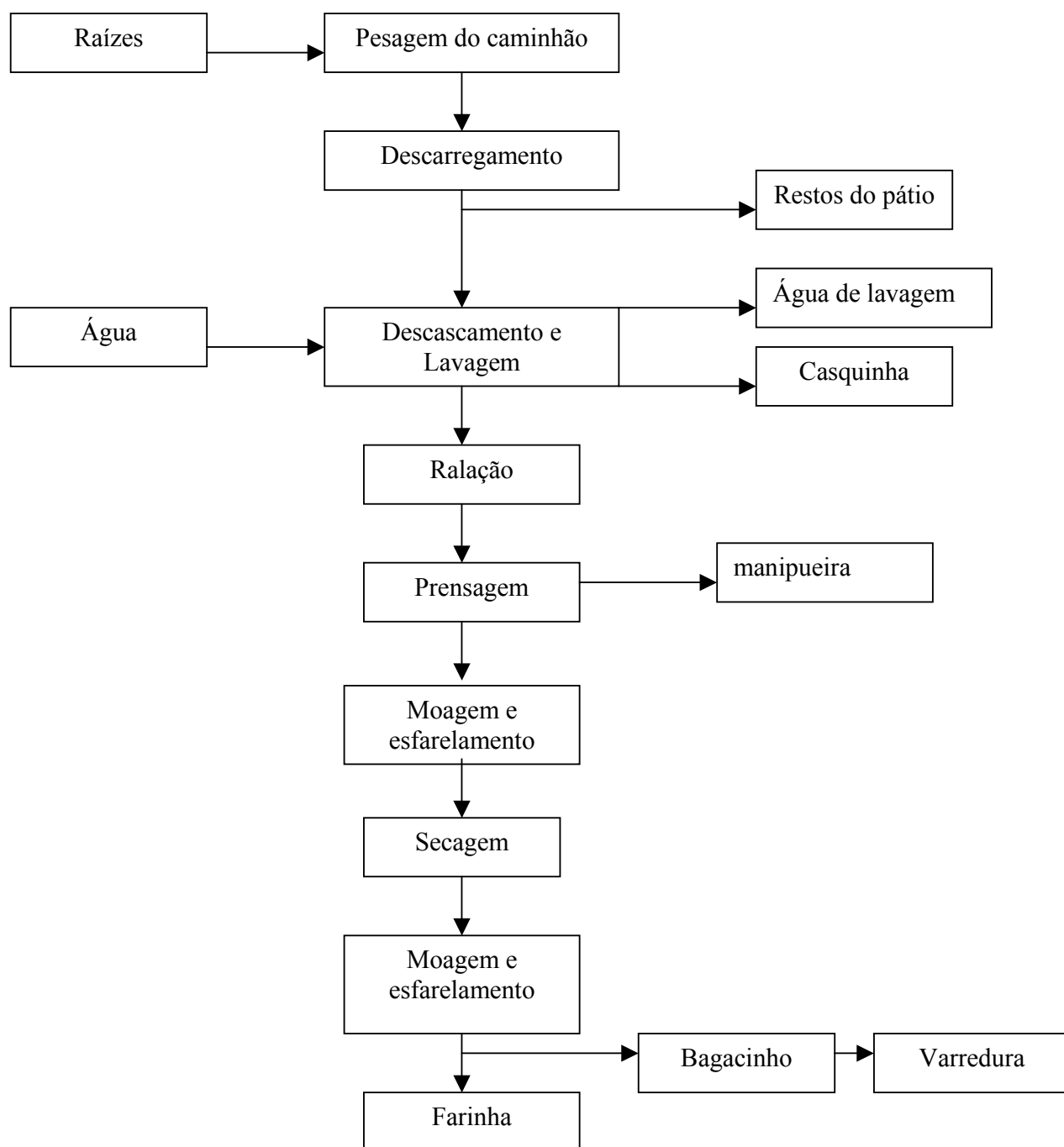


Figura 1- Fluxograma do processamento de uma fábrica de farinha de mandioca. Del Bianchi,1998.

Tabela 2 – Resíduo do processamento de mandioca em agroindústrias instaladas no município de Ubirajara/SP (em toneladas).

Material	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Subtotais
Matéria prima processada	400	480	400	80	1280
Resíduo de raízes	8	4	4	8	24
Resíduos de cascas	20	16	16	16	68
Resíduo líquido	188	226	188	36	638
Resíduo amido decantado	14	14	12	-	40
Resíduo amido fermentado	4	4	-	-	8
Água desidratação do processo	58	86	78	2	224
Produto final	166	130	108	16	420

Fonte: CABELLO et al, 2002

Tabela 3 – Tabela com os valores das análises centesimais efetuadas nos resíduos.

	Entrecasca	Palito descarte	Cepas	Cascas externas	Ponteiros raízes	Amido decantado	Amido fermentado
Umidade(%)	67,5	56,5	61,7	65,8	72,0	57,3	75,5
Umidade Seca(%)	6,0	4,7	5,7	3,9	9,0	6,2	4,8
Cinzas(%)	2,6	2,0	6,35	19,6	2,1	1,24	4,38
pH	5,6	5,4	5,9	5,2	5,1	4,5	4,4
Mat.Graxa (%)	0,85	0,68	0,60	0,6	0,57	0,13	13,11
Proteínas (%)	3,15	1,5	2,34	2,7	2,21	1,12	15,69
Fibras (%)	6,4	2,92	3,80	23,6	7,0	1,59	2,0
Amido(%)	70,0	78,8	73,2	46,0	67,15	81,7	56,7
Açúcares Red (%)	3,0	0,95	2,0	0,3	0,5	0,1	0,22

Fonte: CABELLO et al, 2002

Os resíduos que são descartados ao ambiente poderiam ser coletados e numa central de processamento ser transformado em, por exemplo, álcool etílico.

2.4 Produção de álcool etílico a partir do amido decantado

Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agro-industriais cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social, portanto, é importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grande quantidade no país.

A mandioca foi vista como tendo potencialidades para ser usada na fermentação etanólica, inclusive na produção de álcool carburante, entretanto, no Brasil a cana de açúcar tem se apresentado como um concorrente com significativo baixo custo de produção.

Atualmente, pensar em álcool carburante de mandioca é inviável, principalmente em comparação ao processo a partir de cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool fino a partir de resíduo amiláceo de farinhas, tem se mostrado bastante interessante para os industriais da área, pois este produto apresenta um maior valor de mercado que o álcool carburante, enquanto que a fonte de carbono praticamente não apresenta custo.

2.4.1 Processo de hidrólise e sacarificação de amido

Para a produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas faz-se necessária a hidrólise do amido, pois este não é fermentado pela levedura alcoólica. A hidrólise dos biopolímeros constituinte dos grânulos de amido quebra as ligações glicosídicas progressivamente, gerando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de catalisadores químicos ou enzimáticos capazes de catalisar a quebra das ligações glicosídicas, além da temperatura.

Para a hidrólise/sacarificação do material amiláceo podem ser utilizados três processos: ácido, ácido-enzimático e enzimático. O processo mais simples de hidrólise do amido é o ácido, onde uma pasta de amido, com concentração em torno de 50%, recebe ácido, geralmente HCl concentrado, na proporção de 0,1 a 0,2% sobre o peso seco de amido. Esta

suspensão é então submetida à ação do calor por período de tempo que depende do processo. Contudo, não é indicado para a produção de aguardente devido à formação de muitos compostos secundários, o que interferiria na qualidade da bebida. (SUMERLY; ALVAREZ,1997).

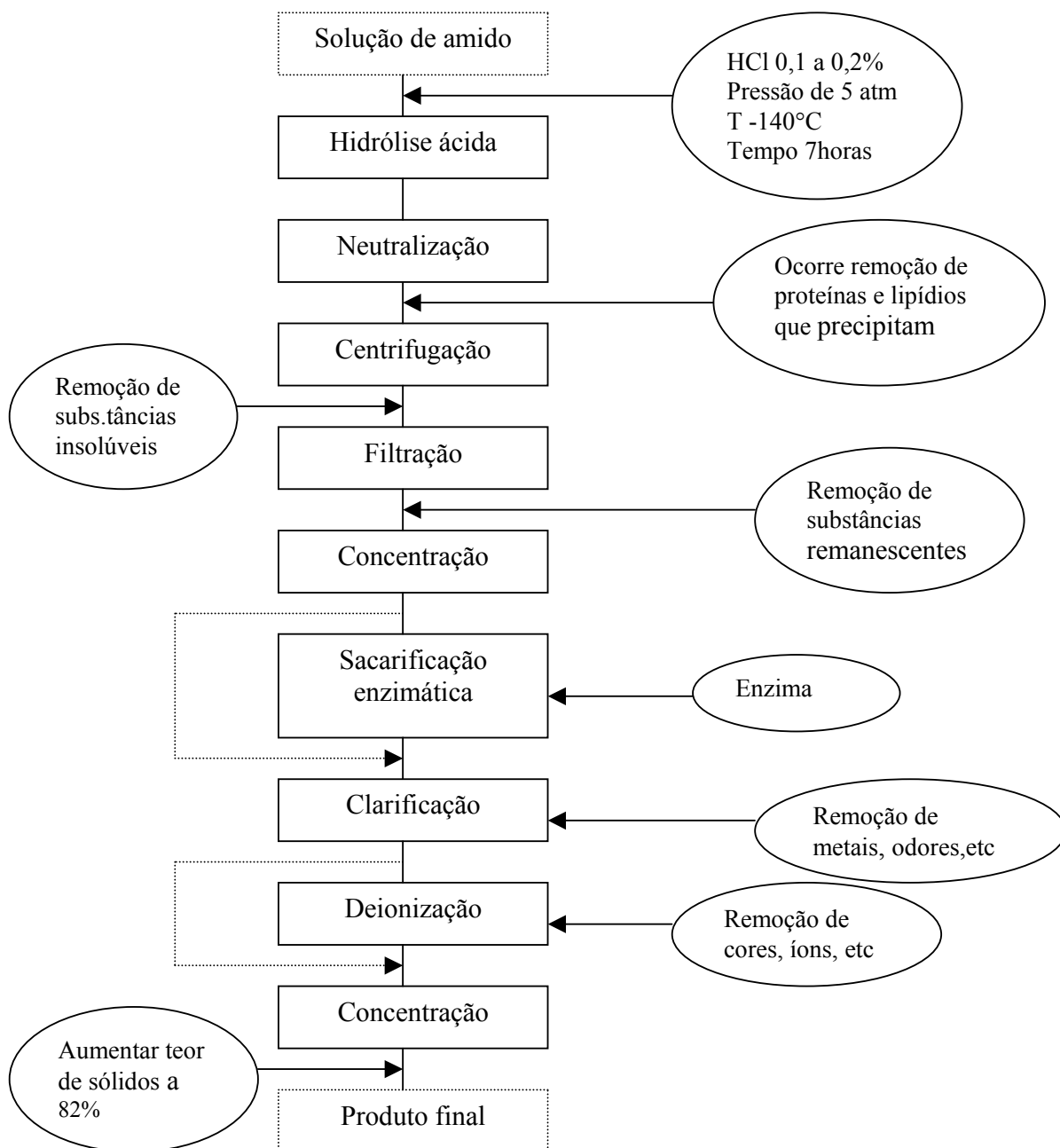


Figura 2 - Fluxograma com o processo de produção de hidrolisado pelo método ácido-enzima

No processo ácido-enzima, o amido é hidrolisado numa primeira etapa com ácido e a seguir sofre tratamento com enzima específica. Esta etapa é chamada de sacarificação que, dependendo do tipo de enzima utilizada, produz maior proporção de glicose, maltose ou dextrinas. Este processo de conversão ácido/enzima permite produzir vários tipos de hidrolisados, mas não é adequado para obter-se o hidrolisado com mais de 90% de glicose, devido a reações de retrogradação, que são catalisadas pelo ácido, formando ligações tipo beta-glicosídicas, que não são hidrolisadas por glucoamilases. (MARC; ENGASSER, 1983)

Já no processo enzima-enzima, utiliza-se duas enzimas, uma para a liquefação e outra para a sacarificação do amido. A liquefação é catalisada por uma enzima que hidrolisará o amido em dextrinas e polímeros menores promovendo a liquefação do meio. Na segunda etapa, é utilizada uma enzima sacarificante que completará a hidrólise produzindo glicose. A natureza, a dosagem, a temperatura, o pH e o tempo de ação desta enzima influenciam na composição final da solução após a sacarificação. (MERCIER, 1985)

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e mais particularmente à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido. (MERCIER, 1985) Elas podem ser compartilhadas pelo mecanismo de ação ou pela ação em si. (ROBYT, 1984; FORGARTY, 1983)

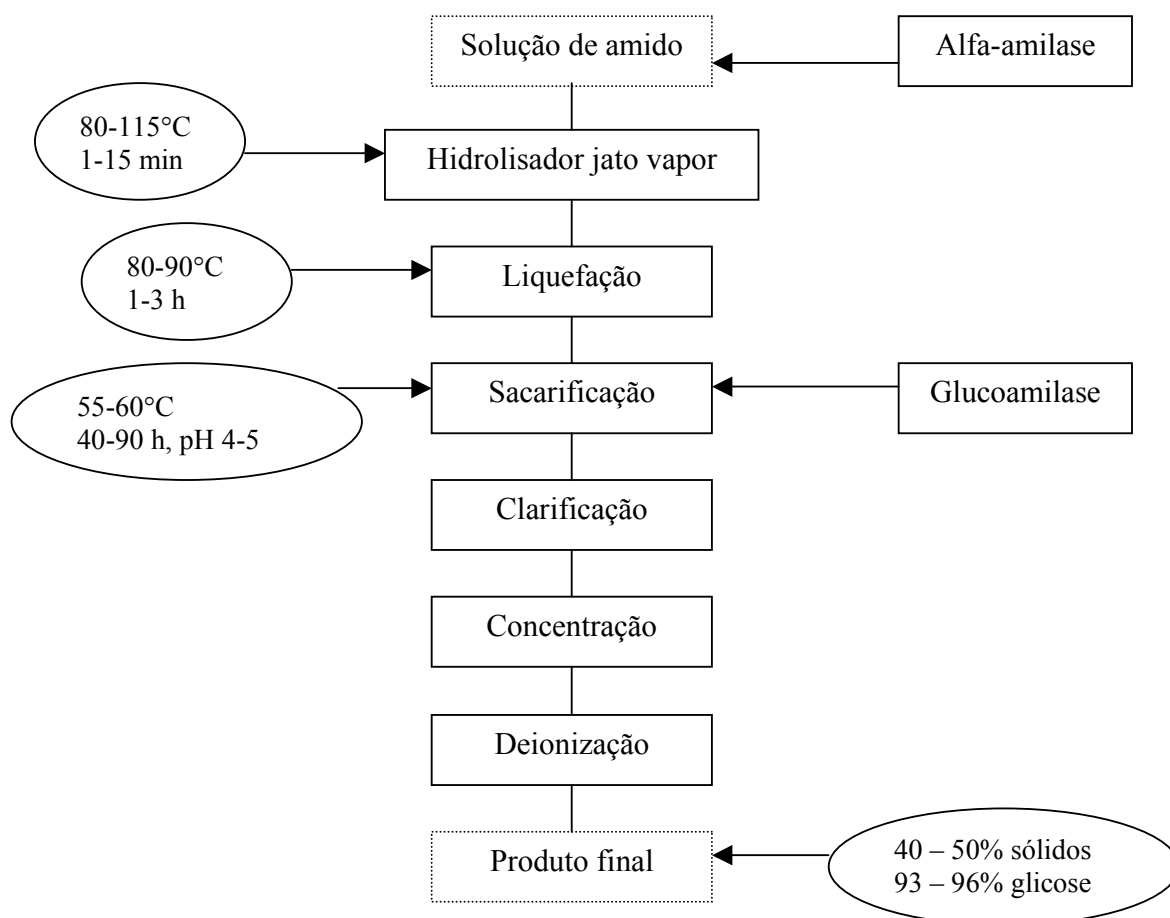


Figura 3 - Fluxograma do processo de produção de hidrolisado pelo método enzima-enzima.

2.4.2 Enzimas Amilolíticas

As enzimas que quebram indiferentemente as ligações glicosídicas no interior da molécula são chamadas de endoenzimas (α -amilase, pululanase). Por outro lado, são chamadas de exoenzimas (β -amilase, amiloglicosidase, CGTase) aquelas que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora,

Existem ainda as enzimas "desramificantes": R-enzima, amilo-1,6-glucosidase, pululanase, isoamilase e oligo-1,6-glucosidase. Estas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações $\alpha(1-6)$ do amido, e possuem características e especialidades diferentes.

A ação sinérgica da α -amilase e amiloglicosidase no processo de hidrólise, vem sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens. (GRAEL, 1989).

Todas as α -amilases são cálcio-metaloenzimas havendo no mínimo um átomo deste metal por molécula. Em presença de cálcio, as α -amilases são mais resistentes à valores extremos de pH, temperatura, tratamento com uréia e ao ataque de enzimas proteolíticas. (GRAEL, 1989)

A amiloglicosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações do tipo α -1,4 e α -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 (FUGII et al., 1988).

Durante a hidrólise do amido, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade da molécula do substrato. A velocidade de hidrólise depende do tipo (linear ou ramificada) e da extensão da cadeia: as ligações α -1,4 se hidrolisam mais facilmente que as ligações α -1,6, porém a maltotriose, e especialmente a maltose, hidrolisam-se mais lentamente que os oligossacarídeos.

Estudos sobre o efeito de hidrólise de amidos originários de mandioca no perfil de açúcares e fermentação alcoólica feitos por Abraham et al. (1987) demonstraram que no método enzima-enzima 96% dos açúcares totais presentes no hidrolisado era glicose, teor superior ao obtido pelo método ácido-enzima (86%); foram observados pequenos teores de maltose e maltotriose, tanto no método enzima-enzima quanto no ácido-enzima.

Para definir os valores de amido que se transformaria em glicose, foi assumida a seguinte conversão:

- Quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre a incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio. Estequiometricamente, cada mol de glicose produzida incorpora um mol de água.

- Considerando que:

1mol de glicose = 1mol de H₂O + massa de amido, então:

180,16g de glicose = 18g de água + 162,16g de amido ou

100g de amido teoricamente produz 111,1g de glicose.

Segundo Lloyd e Nelson (1984), um hidrolisado com alto teor de glicose apresenta concentração de glicose de 94% em peso e dextrose equivalente de 96,28, pode-se então calcular a concentração máxima de conversão a partir do amido.

A dextrose equivalente (D.E) é uma estimativa do grau de hidrólise do substrato amiláceo, um hidrolisado com 100 D.E, possui 100% de glicose.

2.4.3 Fermentação alcoólica

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato por fermento vivo ou por princípio ativo extraído deste fermento. O setor alcooleiro no Brasil, utiliza-se de leveduras do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens. Nas grandes indústrias produtoras de etanol são usadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação. (BELLUCO, 2001)

2.4.3.1 Levedura

As leveduras são organismos eucariotos e suas estruturas correspondem basicamente àquelas de outras células eucarióticas. As células são esféricas, elípticas ou cilíndricas, variando grandemente em suas dimensões. A reprodução ocorre por gemação, esporulação ou fissão, sendo mais comum à gemação ou brotamento. (LIMA, 2001)

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo fermentativo, as quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. As leveduras são capazes de assimilar mono, di e trissacarídeos e como são aeróbios facultativos, os produtos finais da metabolização dos açúcares irão depender das condições ambientais em que ela se encontra. Uma fração do açúcar é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose (fermentação alcoólica). Juntamente com o etanol e CO₂, o metabolismo anaeróbio permite formação de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e

outros), álcoois superiores, acetaldeídos, acetoína, etc. e simultaneamente ocorre o crescimento das leveduras.

Estima-se, que 5% do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar tais produtos secundários da fermentação.

Tabela 4 – Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.

Produto da fermentação	Pasteur	Jackman, 1987	Basso et al. 1996
	95%	90 –95%	85-92%
Etanol	48,5	45,0-49,0	43,0-47,0
Gás carbônico	46,4	43,0-47,0	41,0-45,0
Glicerol	3,3	2,0-5,0	3,0-6,0
Ácido succínico	0,6	0,5-1,5	0,3-1,2
Ácido acético	-	0,0-1,4	0,1-0,7
Óleo fúsel	-	0,2-0,6	-
Butilenoglicol	-	0,2-0,6	-
Biomassa (massa seca)	1,2	0,7-1,7	1,0-2,0

Fonte: (LIMA, 2001)

Segundo Reed e Nagodawithana (1991), as leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas devem apresentar as seguintes características: alta tolerância ao álcool e bom rendimento; fermentar rapidamente o meio e, portanto, minimizar o risco de contaminação; produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis. Russel et al. (1987) acrescentam ainda, que as leveduras devem apresentar estabilidade genética e ao fim da fermentação podem ser facilmente removidas do meio de fermentação por floculação ou centrifugação.

2.4.3.2 Necessidades nutricionais

Entre as necessidades nutricionais das leveduras, assim como a outras formas de vida, estão os elementos químicos; carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, zinco, etc., além de co-fatores para o crescimento como as vitaminas. Especificamente a *Saccharomyces cerevisiae* cresce melhor em meios ácidos (pH 4,5 - 5,0) e numa faixa de temperatura (30 a 34°C).

Tabela 5 – Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter uma fermentação alcoólica adequada.

Nutrição mineral	Concentração em mg/L	Nutriente mineral	Concentração em mg/L
NH ₄ ⁺	40-5900	Co ⁺⁺	3,5
P	62-560	Zn ⁺⁺	0,5-10
K ⁺	700-800	Cu ⁺⁺	7
Ca ⁺⁺	120	Mn ⁺⁺	10-80
Mg ⁺⁺	70-200	Fe ⁺⁺	0,2
SO ₄ ⁺	7-280		
Na ⁺	200		

Fonte: (LIMA, 2001)

2.4.3.3 Melaço

No processo fermentativo de uma fonte amilácea é necessário um aditivo a fim de contemplar as necessidades nutricionais do mosto. Uma alternativa economicamente viável neste processo de recuperação de resíduo é o melaço, largamente utilizado na produção de etanol e facilmente fermentescível pela levedura.

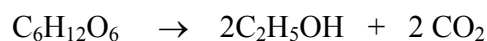
Conforme o tipo de processamento do açúcar utilizado nas usinas para produção de açúcar a partir de cana, obtém-se produtos denominados, melaço de primeira, mel pobre de primeira, mel rico de segunda, melaço de segunda e mel final, também chamado de mel residual.

No Brasil, todos os materiais que se disponibilizam para a destilaria na etapa final, quaisquer que seja sua composição, denomina-se de mel final. Sua composição varia de acordo com o processo de produção do açúcar, LIMA et al. (2001).

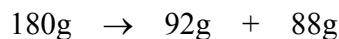
2.4.3.4 Equação de Gay-Lussac

A fermentação alcoólica de açúcares fermentescíveis na presença de leveduras obedece à ordem seqüencial de reações metabólicas da via de Embden - Meyerhof - Parnas (LIMA, 2001).

O fenômeno como um todo pode ser representado pela equação de Gay - Lussac, que serve de base para cálculos de eficiência:



O balanço de massa teórico, indica que 1 mol de glicose é convertida a 2 moles de etanol e 2 moles de gás carbônico, que em termos mássicos seria:



Com um rendimento teórico de 51,1% sobre a massa da glicose.

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras produzem etanol, dióxido de carbono, e um grande número de componentes secundários como glicerol, ácido succínico e ácido láctico; sendo os mais abundantes os álcoois superiores; porém, muitos compostos presentes em menores quantidades também desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor das bebidas (LEHTONEM; JOUNELA-ERIKSOSON, 1983).

2.4.3.5 Processo Biostil

O Processo Biostil, patenteado pelas indústrias Alfa-Laval e hoje controlado pela Nobel Chematur, e introduzido pela Construtora de Destilarias DediniS/A – CODISTIL, demonstra uma planta otimizada com alto desempenho, além da continuidade do processo fermentativo, alia um modelo de fermentação com alta pressão osmótica. Com o retorno da vinhaça para auxiliar a diluição do melaço, o processo apresenta uma vantagem adicional, que é de reduzir sensivelmente o volume de vinhaça que se obtém da destilação. O volume reduz-se de 10 litros de vinhaça por litro de álcool, para volume da ordem de 2 litros por litro de álcool produzido (LIMA et al, 2001).

Este processo Biostil inicia-se com uma levedura do gênero *Schizosaccharomyces*, tolerante a alta pressão osmótica. O inóculo é colocado em contato com o mosto, preparado com melaço ou xarope de cana-de-açúcar em um único fermentador, provido de agitação e de uma fraca aeração, para garantir a multiplicação da levedura. À medida que o processo se desenvolve, o mosto em fermentação tem sua temperatura continuamente controlada pelo trocador de calor. O vinho é continuamente centrifugado; o leite de leveduras retorna ao fermentador único e o vinho deslevedurado encaminha-se à coluna de destilação através do trocador onde se aquece refrigerando a vinhaça que vai ao fermentador, no qual dilui o melaço ou xarope. Na coluna de destilação, é retirado o álcool de cabeça e na coluna de retificação, o etanol. Na base da coluna escoam a vinhaça residual (LIMA et al, 2001).

2.4.3.6 Fatores que interferem a fermentação

Vários são os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, fermentação, o método de condução do processo fermentativo, destilação, envelhecimento, etc. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas pois, é durante a fermentação que a maioria dos compostos do sabor são formados (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979; LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSOSON, 1983).

Salientam-se ainda as variáveis que exercem efeito significativo sobre o rendimento ou eficiência da fermentação: a qualidade da matéria-prima, as condições fisiológicas do inóculo e fatores ambientais como pH, nível inicial de contaminantes, temperatura, concentração do substrato no mosto, composição nutricional do mosto e concentração do álcool produzido (HORII, 1978).

2.4.4 Destilação

Após a fermentação, os meios açucarados passam a denominar-se vinhos, com uma constituição variável, mas encerrando sempre substâncias gasosas, sólidas e líquidas. As primeiras representam-se principalmente pelo dióxido de carbono, que se dissolve em pequena proporção. Os sólidos se fazem presentes pelas células das leveduras alcoólicas, de bactérias contaminantes, sais minerais, açúcares não fermentados e impurezas sólidas em suspensão. (LIMA et al, 2001)

Os líquidos mais importantes são água e o etanol, em porcentagens que variam de 88 a 93% e 12 a 7%, respectivamente, nos vinhos comuns. Os álcoois amílico, isoamílico, propílico, butírico, isobutírico, aldeídos, ácidos, furfurool, ésteres e ácidos orgânicos constituem outra parcela de líquidos de pequena importância em relação ao volume, mas de grande efeito na qualidade dos destilados, sobretudo no caso das aguardentes, nas quais se denominam de impurezas voláteis. A glicerina também se forma durante a fermentação. (LIMA et al, 2001)

Desse material impuro e heterogêneo, separa-se o etanol por destilação, em grau de pureza e concentração variáveis. Nessa operação, geram-se vapores de álcool e água, que depois de resfriados formam um líquido de concentração superior a do vinho e isento de substâncias sólidas. (LIMA et al, 2001)

A tecnologia da destilação, independentemente do tipo de aparelho, influi decisivamente na constituição e no teor do coeficiente não-álcool. As destilações lentas produzem um destilado com melhores características organolépticas, com mais ésteres, menos acidez e menos álcoois superiores. A destilação altera a composição do destilado não só pela proporção relativa dos compostos, mas também pelas reações químicas que ocorrem durante o aquecimento (RIJKE; TERHEIDE, 1983).

Há uma diferença entre as colunas de destilação para aguardentes e as para a produção de flegma industrial, ou seja, o destilado que a seguir, se submeterá à nova destilação, para purificação e concentração do álcool. Este se obtém em colunas que se denominam de alto grau. (LIMA et al; 2001)

O fracionamento da mistura hidroalcoólica ocorre em torres de destilação, empregando-se colunas de baixo grau para obtenção de aguardente com cerca de 50% de álcool em volume. Para a obtenção de álcool industrial, submete-se o destilado da primeira coluna à uma segunda destilação em colunas retificadoras, cuja função é purificar e concentrar o álcool, obtendo-se um teor alcóolico no máximo de 97,2% em volume.

2.5 Etanol produzido a partir de fontes amiláceas

Atualmente, pensar em álcool carburante de mandioca é inviável, principalmente em comparação ao processo a partir da cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool etílico de qualidade a partir de resíduos da industrialização da mandioca tem se mostrado bastante interessante para os industriais da área, pois estes apresentam maior valor de mercado que o álcool carburante, enquanto que a matéria-prima praticamente não apresenta custo. (LEONEL, 1998)

O álcool etílico hidratado, do ponto de vista químico, não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986).

Diante do interesse de industriais na possibilidade de aproveitamento dos resíduos da industrialização da mandioca para produção de farinha, como substratos para

produção de álcool, etílico hidratado fino ou álcool fino, faz-se necessários estudos que otimizem o processo e o torne técnico-economicamente viável.

Operacionalmente, o processo de produção de álcool fino é idêntico ao de produção de álcool hidratado carburante ou industrial. Devido às características próprias, há a necessidade de manutenção das cargas das colunas de destilação na faixa de trabalho e também a impossibilidade de se obter álcool fino com duas colunas (COPERSUCAR, 1987).

O álcool fino constitui-se principalmente em bem de produção intermediário, ou seja, matéria-prima para as indústrias de bebidas, perfumaria, farmacêutica e eventualmente indústrias químicas e alimentícias. Na indústria de bebidas, o álcool fino é usado principalmente na fabricação de vodca, licores e aperitivos e também para a correção do teor alcoólico em vinhos, sendo este o maior mercado. Já nas indústrias de perfumaria é usado desde a extração de princípios ativos naturais até a elaboração dos perfumes. Na indústria farmacêutica é usado na extração de princípios ativos naturais e como diluente.

Em 2001/2002 foram exportados aproximadamente 256 mil m³ de álcool (fino e hidratado de cana) com um valor total de US\$ 92.173.267, sendo que os três maiores compradores foram Coréia (54 mil m³), seguido do Japão (51 mil m³) e Jamaica (34 mil m³).

No Brasil, as destilarias que produzem álcool fino utilizam cana ou milho como matérias-primas, sendo a mandioca utilizada por pequenas destilarias para a produção de bebidas destiladas. No Estado de São Paulo, existem algumas destilarias de álcool de cereais localizadas na região de Assis e Campinas, e estas utilizam o milho como matéria-prima. Via de regra, o milho utilizado apresenta tratamento para utilização como semente e, portanto, impróprio para o consumo como alimento ou ração animal. Estas matérias-primas são descartes de empresas fabricantes de sementes que não apresentaram rendimento adequado ou prazo de validade vencido.

Outra demanda que se apresenta para álcoois produzidos a partir deste resíduo está na relação de isótopos. Os álcoois originários de plantas de metabolismo do tipo C3 (caso da mandioca), em relação às plantas de metabolismo C4 (caso da cana-de-açúcar); esta relação é importante quando há necessidade de correção de teor alcoólico de bebidas. (DUCATTI, 2004)

O processo de fotossíntese consiste em três fases; a primeira é fotoquímica onde ocorre a absorção de energia luminosa, a segunda quando há transferência de elétrons, produção de NADPH₂ e ATP, e a terceira fase, a bioquímica onde ocorre a síntese de carboidratos. Nestas rotas bioquímicas, o primeiro composto orgânico sintetizado pode conter três ou quatro átomos de carbono. As plantas que possuem ciclo bioquímico onde o primeiro composto orgânico sintetizado possui três átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo C3. Por outro lado, as plantas em que o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo C4. (DUCATTI, 2004)

As proporções de álcoois advindos de plantas dos ciclos fotossintéticos C3, C4, CAM, expressas como uma relação entre o isopentanol/isobutanol e n-propanol/isobutanol, se situam em faixas distintas e típicas para cada bebida. Estas relações, tem como objetivo a elucidação da origem, falsificação e identidade das bebidas alcoólicas, não se aplicando à avaliação da qualidade das mesmas. (OLIVEIRA,2001) A legislação permite adições de quantidades específicas de álcool para cada bebida.

2.6 Componentes

Os aldeídos possuem grande importância industrial, sendo empregados em fragrâncias de sabões, detergentes, cremes, perfumes, e como aditivos em alimentos. (SUOMALAINEN et al.,1979) Os aldeídos furânicos, 5-hidroximetilfurfural e furfural, ocorrem em vários produtos alimentícios processados, e o teor destes serve de parâmetro no controle de qualidade de produtos acabados, pois o seu aumento indica o grau de deterioração dos mesmos. (NOVAES et al., 1974)

O furfural e o hidroximetilfurfural podem aparecer no caldo de cana, quando a colheita é precedida da queima da folhagem, o que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial de pentoses, leva ao 2-furaldeído; a desidratação das hexoses, leva ao 5-hidroximetil-2-furfuraldeído. (NOVAES et al., 1974)

A ocorrência de aldeídos em bebidas alcoólicas, fermento-destiladas é oriunda do processo da fermentação e da destilação. Os aldeídos, juntamente com ácidos, álcoois superiores e ésteres, estão presentes nos chamados produtos secundários da fermentação alcoólica. A presença dessas funções químicas em bebidas alcoólicas é

importante, pois contribui para o aroma e o sabor das mesmas. (NASCIMENTO, R.F.; et al,1997)

Compostos carbonílicos tais como o acetaldeído e diacetil estão presentes em pequenas concentrações; mas tendo “threshold” muito baixo, podem desempenhar um papel chave no sabor das bebidas (Berry, 1995). Apesar de diferir quantitativamente, esses compostos estão presentes em todas as bebidas destiladas (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

A toxidez associada aos aldeídos, é muito conhecida e sua presença em bebidas alcoólicas é freqüentemente associada a náuseas, vômitos, inquietação, transpiração, diminuição da pressão sanguínea, aceleração do ritmo cardíaco e dores de cabeça. (LABIANCA, 1974)

O acetaldeído, na presença de álcoois, reage com os grupos amino formando misturas de acetais, os quais aumentam o risco de câncer de mama nas mulheres. Segundo estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS), aldeídos como formaldeído, acetaldeído e benzaldeído são citados como carcinogênicos.(NASCIMENTO, 1997)

Os principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras são os álcoois alifáticos, n-propanol, isobutanol, álcool amílico, álcool isoamílico e os álcoois aromáticos hexanol e 2- feniletanol. (NYKÄNEN; 1986; NYKÄNEN ; NYKÄNEN , 1991)

Relações numéricas baseadas nos teores de álcoois superiores servem de critério de diferenciação entre as bebidas alcoólicas. As relações entre álcool amílico / álcool isoamílico e propanol / isobutanol ocasionam um alto grau de diferenciação entre bebidas alcoólicas de diferentes tipos e procedências. A relação álcool amílico/isoamílico é particularmente característica; por exemplo, o conhaque de boa qualidade e o de qualidade inferior apresentam 0,19-0,24 e 0,24-0,26, respectivamente. Esta relação foi determinada ser, em média, de 0,34 para uísques, 0,22 para brandies e 0,2 pra runs (SMEDT; LIDDLE, 1975).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Resíduo amiláceo

Os resíduos amiláceos consistiram de amidos decantados, originários da prensagem de massa ralada de mandioca, arrastados em suspensão aquosa para adequado tratamento. Foram coletados junto a canaleta visando a sua estabilização de deposição na Fábrica de Farinha de Mandioca Plaza, instalada na cidade de Santa Maria da Serra/SP, e embalados convenientemente, em sacos de PVC. Estes resíduos foram armazenados em câmara fria de -2 a 4°C , para posterior utilização nos ensaios.

A umidade das amostras foi obtida por dessecação em estufa a 105°C até peso constante, empregando o método 44-15 A da AACCC (1995).

3.2 Melaço

O aditivo representado pelo mel final ou melaço, é uma substância concentrada remanescente dos processos sucessivos de cristalização e remoção da sacarose.

O melaço foi fornecido pela Usina de Açúcar da Barra, situada no município de Barra Bonita/SP foi armazenado em baldes com tampa e mantido à temperatura ambiente.

3.3 Caracterização do substrato

O amido decantado e mel residuário foram caracterizados por análises de umidade (%), cinzas (%), pH, acidez titulável, matéria graxa (%), proteínas (%), fibras (%),

amido (%) (RICKARD;BEHN,1987), e açúcares redutores (%) (SOMOGY,1945), empregando metodologias da AACC (1995).

3.4 Ensaios de avaliação do hidrolisado

3.4.1 Preparação e padronização

Preparou-se 7 litros de suspensão aquosa a 15% (p/p) de amido com o resíduo amiláceo, a seguir acrescentou-se 1,5 mL de α -amilase Termamil 120L da NOVO NORDISK de modo que a concentração final fosse equivalente a 1,5 KNU/g (unidade de atividade enzimática desta enzima por gramas, valor fornecido pelo fabricante) de amido seco.

A seguir, a suspensão foi mantida em estufa, à 90°C por 2h, após o que, a concentração de carbono orgânico foi determinada em ppm de carbono, utilizando Analisador de Carbono marca Shimatzu, modelo 5000.

Paralelamente foram preparados 3 litros de solução aquosa com mel residuário e ajustou-se sua concentração, utilizando o Analizador de Carbono Shimatzu modelo 5000, até apresentar a mesma concentração de carbono orgânico que o pré-hidrolizado de amido a 15%, preparado anteriormente.

3.4.2 Preparo do substrato

Com o objetivo de verificar a fermentabilidade do substrato foram propostos ensaios com diferentes concentrações de mel residuário no hidrolisado padronizado. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Em erlenmeyers de 1000mL foram adicionadas as seguintes quantidades: 500mL de solução de mel residual (0%); 475mL de hidrolizado e 25mL de sol. mel residual (5%); 450mL de hidrolizado e 50mL de sol. mel residual (10%); 425mL de hidrolizado e 75mL de sol. mel residual (15%); 400mL de hidrolizado e 100mL de sol. mel residual (20%); 500mL de hidrolizado (100%). Deste modo, cada solução produzida apresentava a mesma concentração de carbono orgânico com diferentes concentrações de aditivo.

3.4.3 Hidrólise e sacarificação

Para a hidrólise das formulações preparadas com amido residual de fécula de mandioca aditivado com o mel residuário, foi utilizada a metodologia descrita por Cabello,

(1995). Em cada um dos frascos erlenmeyers preparados conforme item 3.4.2 foram adicionadas outras duas enzimas amilolíticas; 280 μ L de glucosidase (AMG) da NOVO NORDISK, e 50 μ L de pululanase (PROMOZIME) da NOVO NORDISK, para realizar a hidrólise total do substrato. A solução foi tamponada com tampão acetato para pH 4,8 e mantida em agitação a 60 °C, por 72h. Foram retiradas amostras para avaliar o AR e ART.

3.5 Ensaios de fermentação

3.5.1 Levedura

A cepa utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*, cedida pelo CPQBA, mantida em meio PDA.

Preparou-se um meio YM para desenvolvimento e estoque da levedura utilizando-se 3g de extrato de levedura, 3g de extrato de malte, 5g de peptona, 10g de dextrose, 20g de agar e água destilada quantidade suficiente para um litro. Verteu-se 3mL de meio em tubos de ensaio, posteriormente tampou-se com algodão e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 min.

Após o resfriamento dos tubos de ensaio a cepa foi estriada, e mantida por 24h em estufa a 30°C. Estes tubos foram cobertos com glicerol estéril e mantidos sob refrigeração.

3.5.1.1 Multiplicação da levedura utilizada no ensaio

A multiplicação foi realizada inoculando-se com uma alçada em 100mL de meio YM sem ágar, por 24h, à 30°C. Após, centrifugou-se o mosto à 1500rpm por 5 minutos. A massa úmida decantada produzida foi novamente inoculada, num erlenmeyer contendo 500mL de meio YM permanecendo por 24h, à 30°C. Em seguida, centrifugou-se o mosto nas mesmas condições e a massa de celular foi estocada para uso na inoculação dos ensaios seguintes.

3.5.1.2 Pé de cuba

Para a obtenção do pé de cuba realizou-se a multiplicação da levedura conforme o item 3.5.1.1 e posteriormente foram preparados hidrolisados conforme item 3.4.3 e diluídos de modo a obter concentrações de 5°, 7° e 11° Brix. A massa celular úmida obtida

foi inoculada em 1L de mosto com 5° Brix, após o Brix cair em 50% acrescentou-se 1L de mosto à 7° Brix e quando o Brix atingiu cerca de 50% adicionou-se mais 1L de mosto com 11°Brix, deixando-se a fermentação ocorrer até o consumo integral dos açúcares fermentescíveis.

Centrifugou-se o mosto à 1500 rpm por 10 min, à 4°C utilizou-se 20g deste decantado como inóculo para cada litro de mosto, deixado em fermentação por 24h à 30°C.

3.5.2 Ensaio fermentativo

Os erlenmeyers de 1000mL contendo 500mL de hidrolizado preparados com as concentrações de 0%, 5% 10%, 15%, 20% e 100%, conforme o item 3.4.2, foram inoculados com 10g de levedura obtida conforme item 3.5.1.1. Os erlenmeyers foram mantidos em shaker por 34h a 30°C. O vinho produzido não foi destilado, as análises foram realizadas em HPLC, conforme item 3.7.

3.5.3 Processo de fermentação tipo batelada

Num balão de fermentação, foram adicionados 3,5 kg de amido decantado e 5,8 L de água de forma a obter-se uma suspensão aquosa a 15% (p/p) de amido, a seguir acrescentou-se 3 mL de α -amilase Termamil 120L da NOVO NORDISK de modo que a concentração final fosse equivalente a 1,5 KNU/g de amido seco.

A seguir, a suspensão foi mantida à 90°C por 2h em estufa. Foi adicionada 700 mL de solução aquosa com mel residuário de concentração ajustada à mesma concentração de carbono orgânico que o hidrolizado de amido a 15% preparado anteriormente. Posteriormente, foram adicionadas outras duas enzimas amilolíticas; 0,8 mL de glucosidase (AMG) da NOVO NORDISK, e 0,3 mL de pululanase (PROMOZIME) da NOVO NORDISK, para realizar a hidrólise total do substrato. A solução foi tamponada com tampão acetato para pH 4,8 e mantida em estufa a 60 °C, por 72h.

Este mosto foi inoculado com 200g de levedura (pé de cuba) previamente preparado segundo item 3.5.1. A fermentação foi realizada à temperatura de 28°C por um período de tempo de 34h, sendo que, a cada 2h foi retirada uma alíquota de 15mL para análises cromatográficas de determinação de açúcares redutores e álcoois. Destas alíquotas

foram retirados 1mL e filtrados em membrana de nylon HP 100 μ para avaliação do crescimento celular.

3.6 Destilação do vinho

A destilação foi realizada em coluna de vidro com recheio em processo contínuo. A coluna foi confeccionada no Setor de Vidraria do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, com as seguintes características:

- Diâmetro interno de 50mm;
- Altura total de 2,20m de altura;
- Recheio de tubos de vidro com diâmetro e comprimento de 10mm;
- Alimentação do vinho na altura de 1100mm;
- Caldeira com capacidade para 5000mL;
- Aquecimento elétrico com controle de temperatura;
- Sensor de temperatura no topo da coluna
- Condensador no topo refrigerado com água corrente.

A coluna foi alimentada com o mosto fermentado através de bomba peristáltica a uma vazão ajustada de 70mL/min e temperatura no topo da coluna controlada numa faixa de 78 a 82°C. Durante o processo de destilação foram retiradas 6 alíquotas para analisar álcoois, aldeídos e ácidos orgânicos.

3.6.1 Retificação do destilado

A retificação foi realizada utilizando-se 100ml de álcool destilado e elevando este volume até 200ml com água destilada. Esta solução foi destilada com as mesmas condições da destilação do mosto fermentado.

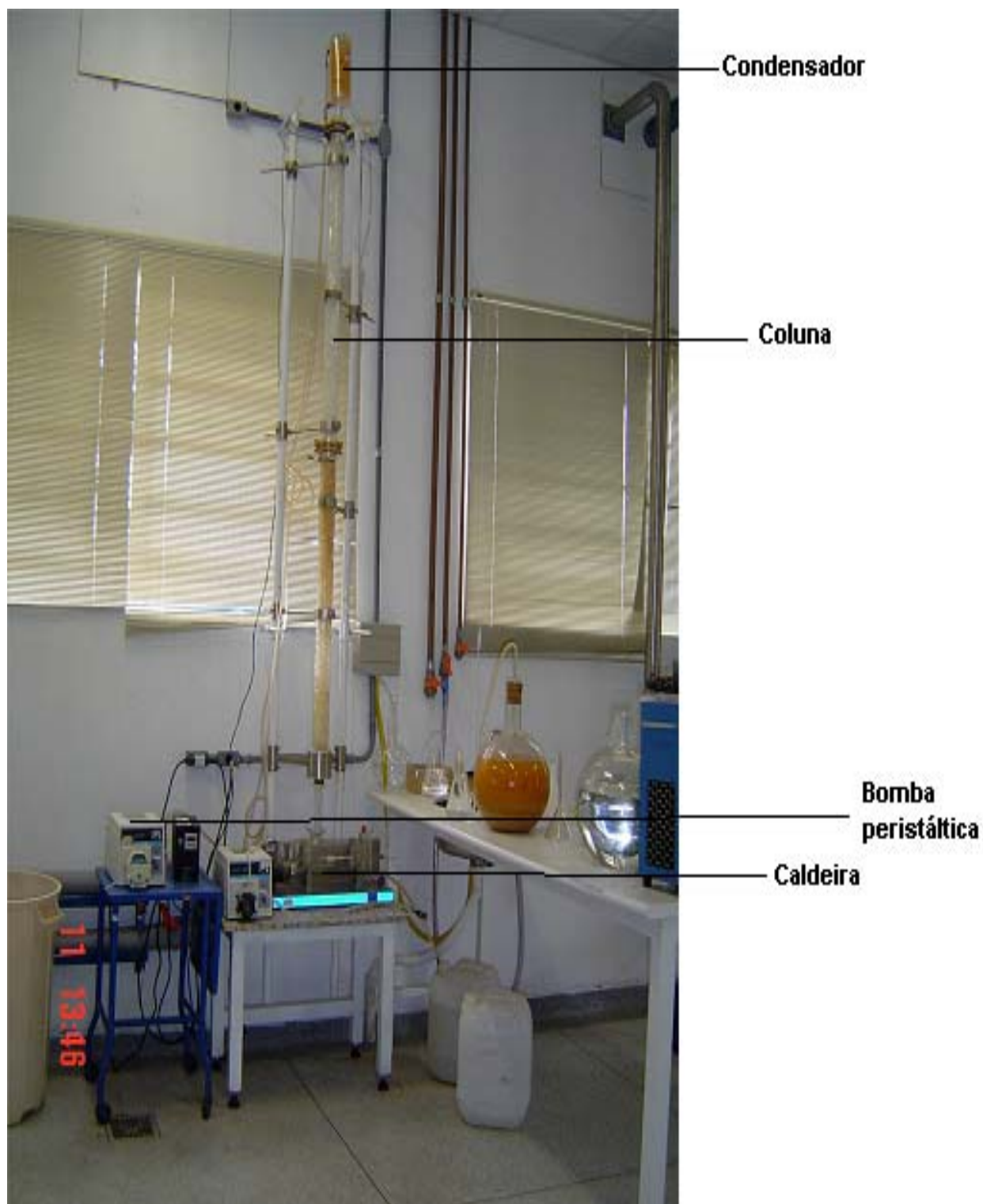


Figura 4 – Coluna de destilação utilizada no projeto.

3.7 Análises para caracterização dos materiais

3.7.1 Concentração de carboidratos e álcoois

Para verificação das concentrações de sacarose, frutose, glicose, glicerol e etanol; foram realizadas análises em cromatografia líquida de alta resolução, em equipamento Varian; com coluna da Biorad modelos: i) HPX-87H na determinação de álcoois, utilizando temperatura de 50°C, fase móvel ácido sulfúrico 0,01M e vazão de 0,7 mL/min; ii) HPX-87P para determinação de glicose, maltose, sacarose, e outros oligossacarídeos, utilizando temperatura de 85°C, fase móvel água deionizada, vazão de 0,6mL/min.

A identificação e quantificação das substâncias foram realizadas por comparação com cromatogramas de substâncias padrões injetados nas mesmas condições.

A amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 8 minutos, em seguida filtrada em membrana PVDF 0,22µm, 13mm de diâmetro, hidrofílica, em vácuo.

Num ensaio complementar, os níveis de amido foram analisados antes e depois da utilização de enzimas.

O destilado obtido foi caracterizado quanto a sua composição química de aldeídos, ácidos orgânicos e álcoois superiores segundo metodologia de derivatização proposta por Nascimento et al (1978).

3.7.2 Preparação dos derivados carboxílicos das 2,4-DNPH

Os derivados carboxílicos da 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH) foram obtidos conforme descrito por Nascimento (2002). Dissolveu-se 0,40g de 2,4-DNPH em ácido sulfúrico concentrado P.A. (2,0 mL) e água destilada (3,0 mL). Nesta solução foram adicionados: 0,10g de aldeídos padrões (acetaldeído, hidroximetil furfural, formaldeído, butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído), dissolvidos em etanol (15,0 mL), num total de 6 soluções. Os correspondentes derivados foram isolados via filtração e purificados por recristalização com etanol absoluto.

3.7.3 Procedimento analítico

Uma solução 0,4% de 2,4-dinitrofenilidrazina foi preparada dissolvendo-se 0,40g em 100 mL de acetonitrila. Em frasco foram adicionados consecutivamente; 1,0 mL da solução de 2,4-dinitrofenilidrazina (0,40%), 4,0 mL de amostra de etanol destilado e 20 µL de H₃PO₄. A solução restante foi agitada e mantida em repouso, por pelo menos 45 min, em temperatura de 25°C. Em seguida, 25 µL da amostra foi submetida à análises cromatográficas em equipamento descrito no item 3.6.1 utilizando coluna de sílica Hypersil BDS – C18, 125X 4 nm, em temperatura de 25°C, fase móvel gradiente metanol/água v/v 65/35% por 6 min, 85/15% por 4 min, 80/20% por 10 min, 75/35% por 5 min, detector UV 365nm, vazão de 0,3mL/min.

A identificação e quantificação das substâncias foram realizadas por comparação com cromatogramas de substâncias padrão, que foram injetadas nas mesmas condições.

3.7.4 Teste de Barbet

Foram retiradas amostras de 50mL de álcool etílico, e transferido, para um tubo de ensaio; o mesmo foi colocado em banho a 15°C e, após estabilizada a temperatura, adicionou-se 2 mL de permanganato de potássio 0,02% ao tubo de ensaio e acionou-se o cronômetro. O tempo foi medido até que a amostra atingisse a cor da solução padrão de Barbet (salmão).

3.8 Processo Piloto

Após a otimização das etapas de formulação e fermentação, testou-se em planta piloto seguindo as etapas conforme diagrama da Figura 5.

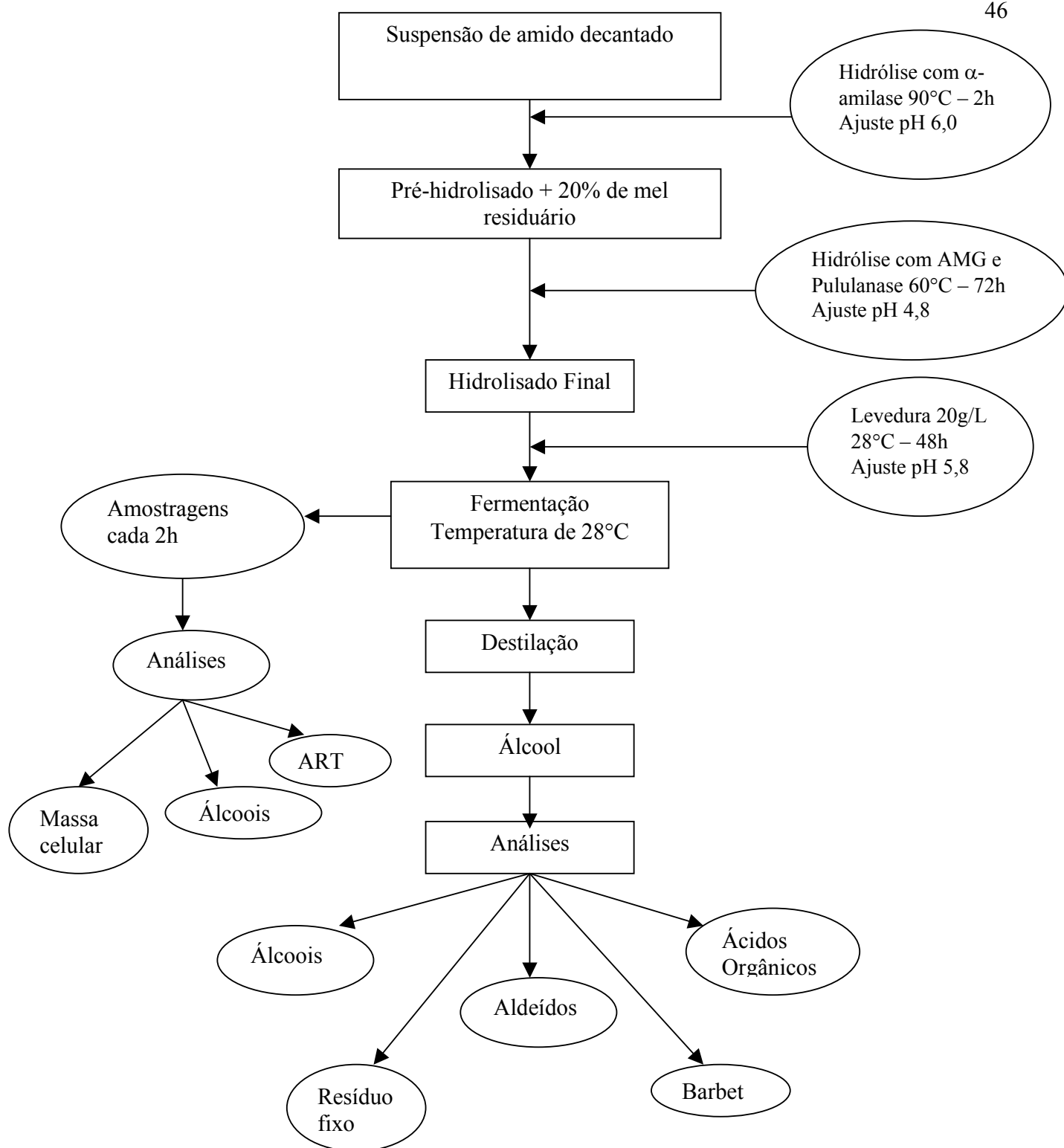


Figura 5 – Diagrama indicativo das etapas do processo fermentativo piloto realizado.

4 DISCUSSÃO E RESULTADOS

4.1 Caracterização do substrato

4.1.1 Melaço

No Brasil, todos os materiais que se disponibilizam para a destilaria na etapa final quaisquer que seja sua composição, denomina-se mel final ou residuário. Sua composição varia de acordo com o processo do açúcar, sendo que LIMA et al. (2001) observou valores semelhante aos obtidos nas análises realizadas na tabela 6.

Analisando os resultados da tabela 6 observa-se um baixo teor de cinzas indicando que o produto possui concentração de sais inorgânicos que provavelmente irão contribuir nos processos fermentativos, se forem utilizados na formulação do substrato.

Tabela 6 – Valores médios das análises centesimais realizadas no mel residuário e valores correspondentes observado na literatura indicada.

Análises	Mel residuário	LIMA et al.(2001)
Umidade %	19,4	20,0
Cinzas %	1,33	8,0
Acidez (mLNaOH/100g)	2,53	-
Matéria graxa %	7,13	-
Proteína %	2,66	3,0
Fibras %	0,12	-
Amido %	2,0	-
Açúcares Redutores %	64,37	62,0
Outros	-	7,0

Com relação à concentração de amidos, em torno de 2%, sua presença se justifica pelos sucessivos ciclos de condensação/cristalização do licor-mãe, que vai concentrando as substâncias remanescentes à separação da sacarose com alto teor de pureza.

Os teores de matéria graxa, cinzas e proteínas podem ser visto como fonte de nutrientes para as leveduras num processo fermentativo.

4.1.2 Amido decantado

Os resultados obtidos nas análises centesimais com o amido decantado, utilizado neste processo, representados na Tabela 7, estão de acordo com os valores obtidos por CABELLO et al. (2003), indicando que este material possui características semelhantes apesar das diferentes origens.

Tabela 7 – Valores médios das análises centesimais realizadas no amido decantado e valores correspondentes observados na literatura indicada.

Análises	Amido decantado	CABELLO et al. (2003)
Umidade %		6,2
Cinzas %	1,25	1,24
pH	4,5	4,5
Acidez (mLNaOH/100g)	7,7	-
Matéria graxa %	0,16	0,13
Proteína %	1,17	1,12
Fibras %	1,50	1,59
Amido %	81,31	81,7
Açúcares Redutores %	0,08	0,1

As baixas concentrações de matérias graxas, proteínas e cinzas demonstram a necessidade da aditivação, pois a deficiência destes nutrientes poderá interferir na condução da fermentação. O valor da acidez titulável caracteriza um amido, que já apresenta ácidos orgânicos, possivelmente, resultante da degradação de açúcares solúveis originários das raízes de mandioca.

4.2. Ensaios para avaliação do substrato

Considerando a presença de amido no mel residuário, foram realizados ensaios para verificar a influência do tratamento enzimático sobre formulações de hidrolisado com diferentes concentrações de mel residuário de sacarose.

4.2.1 Tratamento no substrato

Desta forma, foram realizados ensaios conforme descrito no item 3.4.3, no qual foi observado o comportamento das amostras de mel residuário antes e depois da hidrólise. Foi possível quantificar um aumento médio de 50% no total de açúcares redutores nestas soluções

Semelhante tratamento foi aplicado em amostras de melaço. Os resultados obtidos nas análises de quantificação de açúcares redutores nas amostras de melaço antes e depois do tratamento estão ilustrados no gráfico da Figura 6.

Os resultados demonstraram que houve um aumento de açúcares redutores após o tratamento enzimático, confirmando resultados observados por Najafpour & Shan (2003).

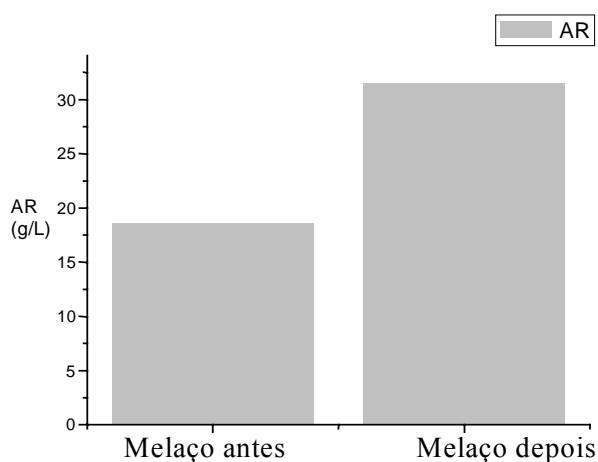


Figura 6 – Concentração de açúcares redutores das amostras de melaço antes e depois do tratamento.

Os dados obtidos através do perfil cromatográfico de amostras de melaço antes e depois do tratamento enzimático especificado no item 3.4.3 estão demonstrados no gráfico da Figura 7. Foi possível observar uma diminuição da concentração de sacarose, e aumento da concentração de glicose e frutose. Não foi possível verificar quantitativamente, na forma de um balanço de massas, para observar o acréscimo na glicose originária dos amidos.

Análises qualitativas realizadas com reativo lugol indicaram ausência de amidos e dextrinas de grande peso molecular.

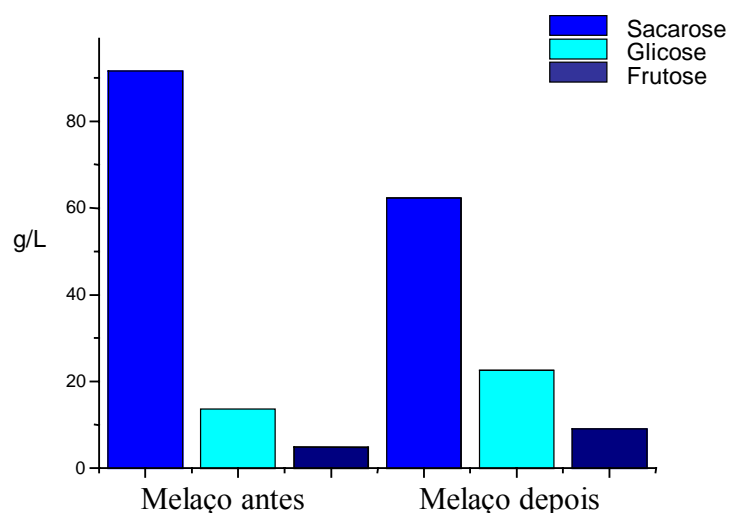


Figura 7 – Perfil dos sacarídeos no melaço antes e depois do tratamento enzimático para hidrólise do substrato.

A alteração no momento da adição do melaço antes de se colocar a segunda enzima possibilitou o desdobramento de parte dessa sacarose, aumentando o rendimento da fermentação, uma vez que, ao término do consumo de glicose a própria levedura faz este desdobramento.

Estão representados no gráfico da Figura 8 os valores de açúcares redutores antes e depois do tratamento enzimático nas formulações contendo 0%, 5%, 10%, 15%, 20% e 100% de melaço, pode-se observar que as amostras mantiveram uma tendência crescente diretamente proporcional ao aumento da concentração do melaço.

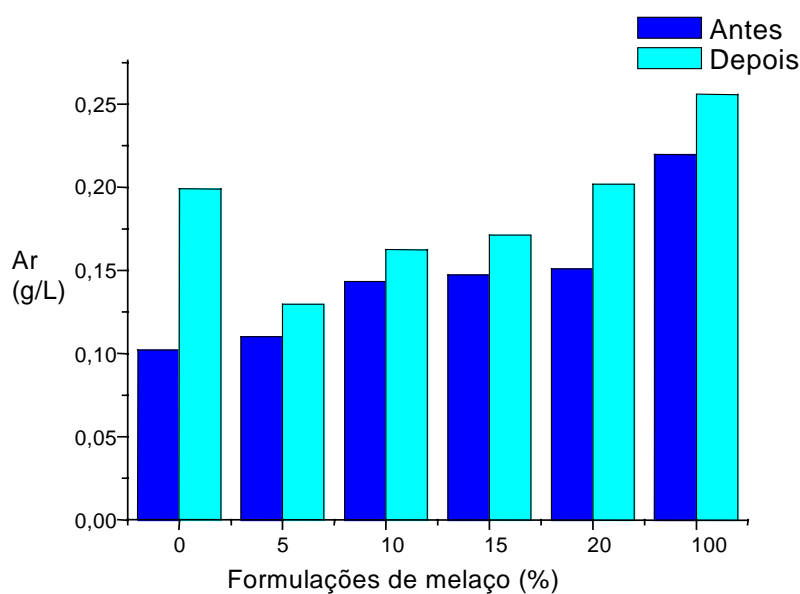


Figura 8 – Valores das concentrações de AR antes e depois do tratamento enzimático nas formulações utilizadas nos ensaios prospectivos.

4.2.2 Ensaio fermentação

As amostras preparadas conforme item 3.4.3 e inoculadas com leveduras conforme item 3.5.1 apresentaram um comportamento em relação ao consumo do substrato conforme se verifica nos perfis da Figura 9.

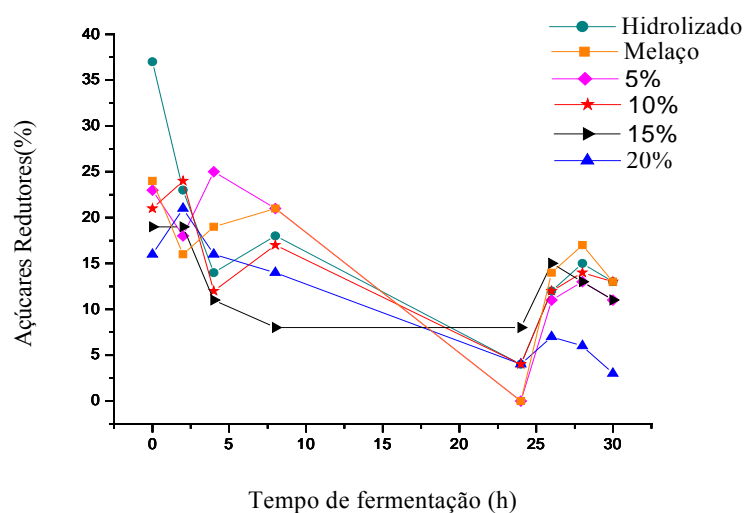


Figura 9 – Gráficos mostrando os perfis de consumo dos açúcares redutores totais das formulações durante o processo de fermentação.

Os resultados obtidos nos primeiros ensaios de tratamento enzimático sobre formulações de hidrolisado com diferentes concentrações de melaço, demonstraram aumento de açúcares fermentescíveis e atuação de enzimas amilolíticas tanto no amido originário do resíduo da mandioca quanto dos amidos originários do melaço. A seleção da melhor formulação foi baseada no aumento de açúcares fermentescíveis totais nas formulações, como segue na Tabela 8 e nos resultados de conversão desses açúcares em etanol durante o processo de fermentação ensaiado como demonstrados na Tabela 9.

Tabela 8 – Valores de concentração de açúcares redutores totais antes e depois do tratamento enzimático nas soluções de composição indicada.

Soluções	Concentração de mel residuário no hidrolisado (%)					
	0	5	10	15	20	100
Antes (g/L)	100,5	110,2	143,2	147,4	151,0	219,5
Depois (g/L)	199,0	129,8	162,5	171,2	201,5	255,8

A partir da concentração inicial de açúcares redutores totais, de cada uma das soluções foi calculada a porcentagem de conversão destes açúcares, no processo fermentativo, conforme estão representados na Tabela 9. Observa-se que o maior consumo ocorreu nas soluções preparadas utilizando 20% de mel residuário.

Tabela 9 – Consumo percentual dos açúcares redutores totais nas fermentações ensaiadas.

Soluções	Concentração de mel residuário no hidrolisado (%)					
	0	5	10	15	20	100
ART inicial (g/L)	199,0	129,8	162,5	171,2	201,5	255,8
ART final (g/L)	117,3	65,9	7,7	7,57	8,80	0,64
Consumo de ART (%)	41,04	49,2	52,6	55,8	56,3	97,5

Analisando os dados observa-se que o substrato formado apenas por hidrolisado de amido residuário, teve o menor índice de consumo no processo fermentativo provavelmente devido a pouca adaptação da levedura aos baixos níveis de nutrientes. De outro lado, o mel residuário foi quase todo convertido 97,5%.

A aditivção do hidrolisado com 20% de mel residuário demonstrou ser o mais adequado às leveduras induzindo-as a consumir 56,3% deste substrato conforme verificado.

4.3 Produção de etanol

No gráfico da Figura 10 estão representados os perfis da concentração de etanol produzido pelas formulações e observa-se que as amostras mantiveram uma tendência crescente inversamente proporcional ao consumo dos açúcares. A formulação composta apenas por mel residuário apresentou uma produção significativa de álcool se comparada com as demais e enquanto que a formulação contendo apenas hidrolisado mesmo contendo grande quantidade de açúcares fermentescíveis não produziu etanol a partir de determinado período. Esta provável deficiência do substrato amiláceo é corrigida quando é aditivado com mel residuário, o que pode ser confirmado e indica a utilização destes resíduos de agroindústrias para produção de etanol em processos fermentativos.

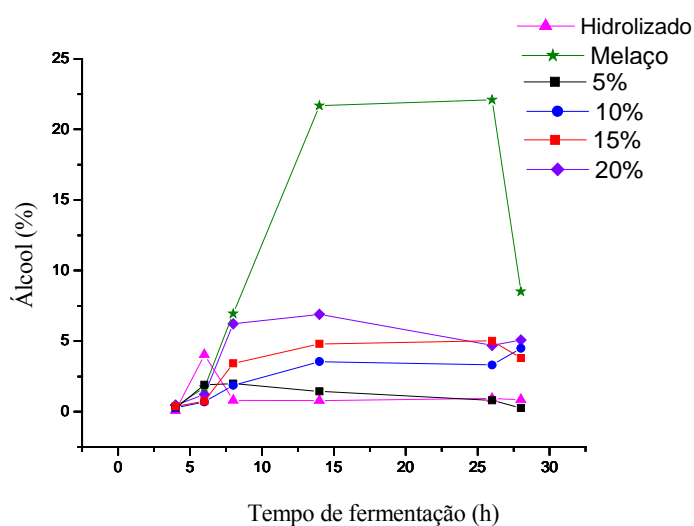


Figura 10 – Perfis de produção de etanol nas fermentações com substratos hidrolisados e compostos com melaço.

Os comportamentos esperados das formulações contendo apenas melaço ou somente hidrolisados serviram de controle no processo, assegurando que não houve contaminação durante as etapas de fermentação.

4.3.1 Índices do processo

O melhor rendimento observado foi com a solução aditivada com 20% de mel residuário, com a produção de 22,33% de etanol conforme a Tabela 10. Num processo de fermentação, admite-se que rendimentos entre 43 e 49% sejam considerados adequados e indicativos de um bom processo de fermentação. Neste caso identificou-se a necessidade de otimizar o processo de fermentação, selecionando melhor a levedura.

Tabela 10 – Resultados da produção de etanol durante a fermentação nas soluções testadas (%) no tempo de 26h

Soluções	Concentração de mel residuário no hidrolisado (%)					
	0	5	10	15	20	100
ART (g/L)	199,0	129,8	162,5	171,2	201,5	255,8
Volume teórico (mL)	130	85	106	87	103	135
Volume prático (mL)	8	10	14	17	23	130
Rendimento de etanol (%)	6,15	11,76	17,54	19,54	22,33	96,29

O processo de adaptação da levedura foi realizado através de sucessivas fermentações em hidrolisado aditivado com 20% de melaço, num total de dez gerações, que seria suficiente para tanto.

4.3.2 Concentração de aldeídos e ácidos orgânicos

O álcool produzido no prospectivo contendo 20% de melaço foi analisado para a verificação da concentração de aldeídos e ácidos orgânicos. Os valores obtidos nas 6 alíquotas recolhidas durante a destilação estão representados na Tabela 11. Observa-se a presença de apenas dois aldeídos: o formaldeído e o furfuraldeído, já os ácidos orgânicos não foram detectados.

Estes resultados são coerentes com aqueles observados por Nascimento (1997), na análise de bebidas alcoólicas destiladas utilizando a mesma metodologia de derivatização dos aldeídos.

O baixo teor de acetaldeído em bebidas está relacionado com alta qualidade do produto. As presenças de furfural e hidroximetilfurfural estão relacionados com o caldo de cana de açúcar quando a colheita é precedida da queima da folhagem, acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial de pentoses, leva ao 2-furfuraldeído, enquanto a desidratação das hexoses, leva ao 5-hidroximetil-2-furfuraldeído.(NOVAES et al.,1974)

Tabela 11 – Identificação e concentração dos aldeídos verificados nas amostras de etanol coletadas durante ensaio prospectivo de fermentação.

Amostras	Acetaldeído (g/L)	Furfural (g/L)	Formaldeído (g/L)	Butiraldeído (g/L)	Benzaldeído (g/L)	Valeraldeído (g/L)
1 Alíquota	-	-	0,02	-	-	-
2 Alíquota	-	0,06	-	-	-	-
3 Alíquota	-	0,02	0,02	-	-	-
4 Alíquota	-	0,01	0,02	-	-	-
5 Alíquota	-	-	0,02	-	-	-
6 Alíquota	-	-	0,03	-	-	-
Média	-	0,15	0,02	-	-	-

As presenças destas moléculas são em parte devido à adição de mel residual que as tem devido ao processo agrícola de produção de cana de açúcar, onde é utilizado o fogo para queimar as palhas e favorecer o corte da cana. (NOVAES et al.,1974) Os ácidos orgânicos não foram detectados nas análises realizadas.

4.3.3 Perfil cromatográfico da concentração de álcoois

As análises cromatográficas não identificaram álcoois superiores, metanol e glicerol nas seis alíquotas retiradas durante a destilação por fluxo contínuo.

Na Tabela 12 observa-se o valor obtido nas 6 alíquotas da destilação, retirado a cada volume aproximado de 100mL de destilado.

Observou-se a presença apenas de etanol . A ausência de glicerol indica que não houve perda de eficiência durante o processo de fermentação. Cada espécie e linhagem de levedura possuem diferenças na produção de compostos secundários como glicerol, álcoois superiores, ácido acético, lático e succínio (REMIZE et al.2000).

Tabela 12 – Concentrações de etanol, metanol e glicerol presentes nas seis alíquotas retiradas no processo. (g/L)

Amostras	Etanol	Metanol	Glicerol
1 Alíquota	2,96	0,00	0,00
2 Alíquota	2,75	0,00	0,00
3 Alíquota	2,58	0,00	0,00
4 Alíquota	2,70	0,00	0,00
5 Alíquota	5,50	0,00	0,00
6 Alíquota	5,90	0,00	0,00
Média	3,73		

Segundo Marques (1991), a temperatura é outro fator que influenciam a produção de etanol em experimentos com fermentação alcoólica do tipo batelada, verificou que a dorna deve ficar entre 26 e 32°C e, que em temperaturas entre 32 e 38°C são encontrados microorganismos concorrentes e prejudiciais.

4.4 Processo Piloto

4.4.1 Resultados dos ensaios piloto

Foram realizadas três bateladas do processo que apresentaram comportamento semelhante em todas as etapas, demonstrando reprodutibilidade.

4.4.1.1 Crescimento celular e consumo de substrato

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo fermentativo, os quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool.

As leveduras são capazes de assimilar, mono, di e trissacarídeos, uma fração do açúcar, é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose (fermentação alcoólica). Juntamente com o etanol e CO₂, o metabolismo anaeróbio permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeídos, acetoina, etc e simultaneamente ocorre o crescimento das leveduras. (RIBEIRO et al, 1987)

O processo piloto de fermentação foi monitorado a cada 2h num total de 12 pontos onde foram avaliados o crescimento da massa celular e o consumo de açúcares fermentescíveis, os valores observados em triplicata estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Crescimento de massa celular e consumo de açúcares redutores totais no processo piloto de fermentação.

Tempo (h)	Massa celular (g/L)	Açúcares Redutores totais (g/L)
0	20	167
2	24,83	161,12
4	35,48	151,57
6	35,63	159,02
8	38,70	154,57
10	40,17	81,34
24	42,70	71,85
26	44,80	60,23
28	45,91	62,09
30	48,78	60,32
32	51,02	56,5
34	51,18	41,85

Os perfis com o consumo de açúcares redutores durante o processo fermentativo e a conseqüente formação de massa celular estão ilustrados nos gráficos da Figura 11.

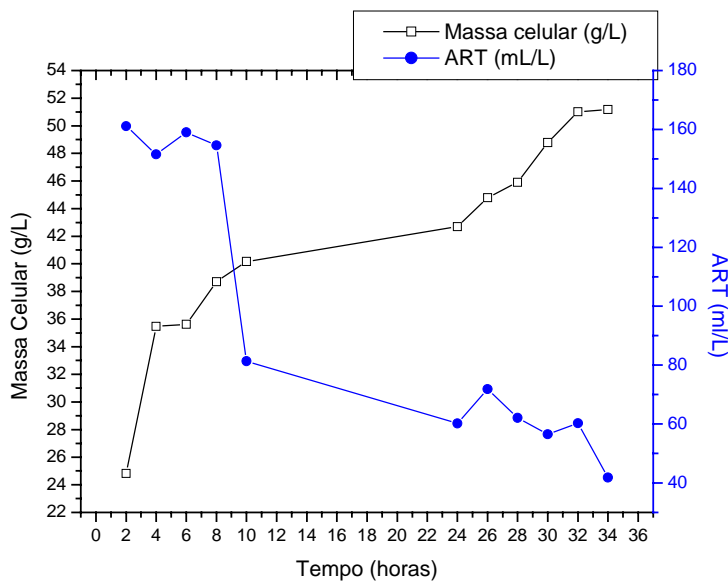


Figura 11 – Perfil do crescimento de massa celular e correspondente consumo de açúcares fermentescíveis em função do tempo de fermentação.

4.4.1.2 Fermentação

A partir das alíquotas coletadas foram realizadas análises por cromatografia, buscando quantificar e qualificar a composição dos álcoois produzidos. Estima-se, que 5% do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar tais produtos secundários da fermentação. (RIBEIRO et al,1987)

Foram observados baixos níveis de glicerol reproduzindo os dados obtidos nos ensaios prospectivos de fermentação, indicando que não houve perda de eficiência durante o processo fermentativo.

Na Tabela 14 estão demonstrados os valores da concentração de etanol, metanol, glicerol. Álcoois de cadeias maiores não foram detectados.

Tabela 14 – Perfis da concentração de etanol, glicerol e açúcares redutores produzidos na fermentação em função do tempo.

Tempo (h)	Etanol (mL/L)	Glicerol (mL/L)	Açúcares Redutores totais (g/L)
0	0	0	167
2	2,17	1,19	161,12
4	3,5	1,57	151,57
6	7,27	2,43	159,02
8	15,48	2,8	154,57
10	69,48	6,35	81,34
24	65,87	5,99	60,23
26	76,85	6,82	71,85
28	78,35	7,01	62,09
30	78,35	6,68	56,5
32	84,45	7,5	60,32
34	97,64	7,79	41,85

Nos gráficos da Figura 12 estão demonstrados os perfis do consumo de açúcares redutores totais e formação de etanol e glicerol.

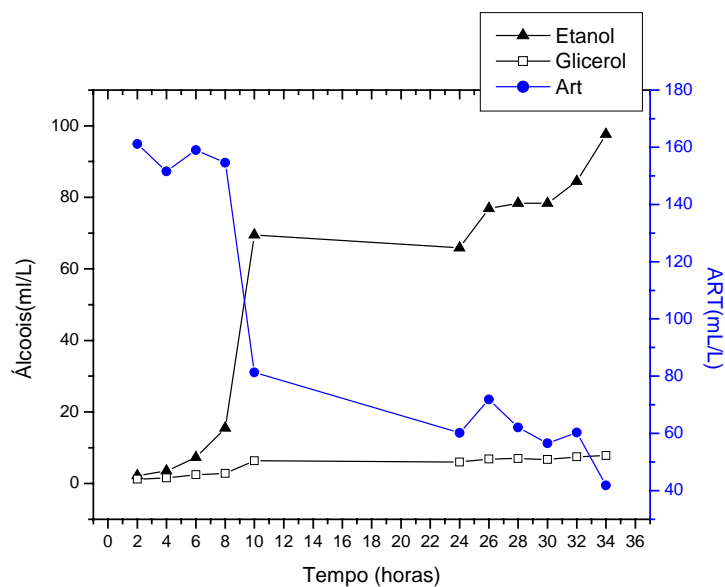


Figura 12 – Perfis da produção de etanol, glicerol e consumo de açúcares redutores em função do tempo.

Ao final da fermentação como demonstrado na Tabela 14, foram quantificados 97,64 mL de etanol por litro de mosto. A produção de álcool esperada num processo fermentativo é de 1L de etanol para cada 10L de vinhaça LIMA et al. (2001) respeitadas as devidas proporções foram produzidos 0,976L para cada 10L, demonstrando um processo fermentativo eficiente.

4.4.1.3 Destilação

O processo de destilação piloto foi monitorado através de coleta de amostras a cada 150mL de álcool etílico destilado. Foram coletadas três amostras. Estas alíquotas foram convenientemente estocadas e analisadas por cromatografia líquida para identificação e quantificação de álcoois, aldeídos e ácidos orgânicos. Para identificação dos aldeídos nas amostras foi necessário derivatizá-las afim de estabilizá-los conforme item 3.7.3 do material e métodos. Na Tabela 15, temos os valores médios obtidos nas três alíquotas durante a destilação do processo piloto.

Tabela 15 – Valores médios dos aldeídos identificados e quantificados nas alíquotas obtidas em g/L

	Furfural g/L	Formaldeído g/L	Acetaldeído g/L	Benzaldeído g/L	Butiraldeído g/L	Valeraldeído g/L
1° Amostra	0,01	0,003	0,00	0,00	0,000	0,000
2° Amostra	0,01	0,001	0,00	0,00	0,001	0,001
3° Amostra	0,01	0,002	0,00	0,00	0,000	0,001

Analisando os resultados observa-se que muitos aldeídos estão ausentes e os valores verificados indicam a necessidade de retificação, ou seja, adicionar água ao etanol até atingir a graduação alcoólica de 50°GL e destilar novamente. Tal procedimento é utilizado em Usinas de álcool para purificação e aumento de concentração do etanol. (LIMA,2001)

Análises cromatográficas não identificaram álcoois superiores nas três alíquotas, assim como no ensaio prospectivo e demonstram a ausência de metanol e glicerol.

Os teores de álcoois superiores servem de critério de diferenciação e qualidade para bebidas destiladas. As relações entre álcool amílico / álcool isoamílico e propanol / isobutanol ocasionam um alto grau de diferenciação entre bebidas alcoólicas de diferentes tipos e procedências. (SMEDT, LIDDLE, 1975).

Com a relação a identificação dos ácidos orgânicos verificou-se que estavam ausentes os seguintes: ácido acético, cítrico, propiônico, isobutírico, isso valérico e butírico.

Na quantificação de álcool obtido após a destilação, pode-se observar uma diferença na quantidade de álcool produzido na última etapa da fermentação em relação ao obtido depois da destilação. O processo de fermentação gerou 97,64 mL/L de etanol para 10L de vinho. A quantidade de álcool obtido após o processo de destilação foi de 81 mL/L.

Observa-se que a etapa de destilação produziu uma queda na separação do etanol do vinho, o que direcionaria para o aperfeiçoamento da mesma realizando ensaios variando temperaturas e fluxos de alimentação do vinho, porém deve-se considerar o alto grau de conversão obtido na fermentação e a origem da matéria prima principal o amido decantado que é um resíduo.

4.5 Álcool de resíduo amiláceo

A qualidade do álcool bem como a terminologia utilizada está definida na Tabela 1, e para situar melhor o álcool produzido neste trabalho foram realizados alguns ensaios comparativos com outros álcoois.

Com a finalidade de comparar as qualidades do produto produzidas, foram realizadas análises cromatográficas em álcool das seguintes origens: de cereais a 96,5°GL; P.A a 99,9°GL; e comercial a 96°GL. Uma amostra do produto obtido foi analisada também a 96°GL. Na Tabela 16 estão expresso os resultados observados.

Pode-se observar uma pequena presença de aldeídos em todos os tipos , mas os álcoois com usos menos nobres como o álcool comercial e o álcool etílico PA, possuem maiores quantidades, inclusive uma presença bem maior de formaldeído no álcool comercial.

No álcool de resíduo amiláceo, observa-se que o aldeído presente em maior quantidade é o furfuraldeído, que está diretamente relacionado com a adição de mel

residuírio de cana de açúcar. Os baixos níveis de aldeídos encontrados nos álcoois de resíduo amiláceo e cereais possibilitam uma comparação maior entre estes.

Tabela 16– Aldeídos identificados e quantificados em amostras de álcool etílico produzido no piloto de ensaio, álcool etílico de cereais, álcool etílico PA e álcool etílico comercial.

Amostra	Furfural g/L	Formaldeído g/L	Butiraldeído g/L	Benzaldeído g/L	Valeraldeído g/L
Álcool etílico (Resíduo amiláceo)	0,0110	0,0049	0,0068	0,0001	0,0016
Álcool etílico (Cereais)	0,0044	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000
Álcool etílico (P A)	0,0780	0,0032	0,0074	0,0049	0,1128
Álcool etílico- (Comercial)	0,1142	0,1815	0,0104	0,0000	0,2184

Realizou-se a retificação de uma amostra do etanol de resíduo amiláceo e após derivatização e análises cromatográficas das alíquotas, os resultados obtidos estão indicados na Tabela 17.

Tabela 17– Aldeídos identificados e quantificados em amostra do produto obtido após processo de retificação.

Álcool etílico retificado (Resíduo amiláceo)	Furfural g/L	Formaldeído g/L	Butiraldeído g/L	Benzaldeído g/L	Valeraldeído g/L
1° alíquota	0,00	0,0036	0,00	0,00	0,00
2° alíquota	0,00	0,0034	0,00	0,00	0,00

O uso mais nobre do álcool etílico é o farmacêutico, e as características visam torna-lo o mais inerte possível não interferindo na composição do produto final, pois em geral serve de veículo. O álcool etílico de cereais, para atender tais requisitos, passa após o processo de destilação por uma retificação. Na Tabela 18, estão representados os valores obtidos após a retificação do álcool etílico de cereais e o álcool etílico de resíduo amiláceo.

A reação de Barbet é uma reação qualitativa que indica a presença de impurezas de origem orgânica na mistura hidroalcoólica, ao produzir variação de cor mediante comparação de cor com solução padrão (COOPERSUCAR,1987).

Na Tabela 18 observa-se que dentre os aldeídos mensurados para o uso farmacêutico, apenas o acetaldeído é considerado crítico, em detrimento aos outros aldeídos tais como formaldeído, acroleína e benzaldeído citados como carcinogênicos.(NASCIMENTO,1997)

Tabela 18 - Comparativo entre as exigências do consumidor para álcool etílico de uso farmacêutico com os resultados dos álcoois etílicos de cereais e de resíduo amiláceo.

	Álcool etílico de cereais	Álcool etílico de resíduo amiláceo	Álcool Etílico uso farmacêutico
Teor	96	96	Min 96,00
Acidez máxima	0,18mg/100mL	N/D*	0,5mg/100mL
Reação de Barbert	40 minutos	> 1 minuto	15minutos
Acetaldeído	N/D	N/D	Max 0,05mg/100mL
Metanol	1,96mg/100mL	N/D	Max 3,00mg/100mL
N-propanol	N/D	N/D	Max 0,05mg/100mL
Isobutanol	N/D	N/D	Max 0,05mg/100mL
N-Butanol	N/D	N/D	Max 0,05mg/100mL
Isoamílico	N/D	N/D	Max 0,05mg/100mL
Isótopos** (% C3)	0,0	97,0	

* Foram realizadas análises cromatográficas com os ácidos orgânicos;

** Análise para distinção da fonte de carbono.

Como complemento para efeitos de comparação do álcool etílico de resíduo amiláceo com o de origem de cereais, foram realizadas análises de isótopos no Centro de Isótopos Estáveis – IB – UNESP/Botucatu. Neste tipo de análise foi possível identificar a fonte de carbono utilizada para a produção do etanol, distinguindo os dois tipos de álcoois, uma vez que o álcool de cereais, proveniente de plantas de metabolismo do tipo C4 ,apresentou 100% de C4 enquanto o álcool de resíduo amiláceo apresentou 97% de C3. A mandioca possui metabolismo do tipo C3, porém os 3% de C4 presentes na identificação do álcool estão relacionados com a adição do mel residuário que provém da cana de açúcar que

possui metabolismo do tipo C4, indicando desta forma que não houve uma proporcionalidade na conversão do carbono contido no melão do substrato (20%) em etanol.

As proporções de álcoois advindos de plantas dos ciclos fotossintéticos C3, C4, CAM, expressas como uma relação entre o isopentanol/isobutanol e n-propanol/isobutanol, se situam em faixas distintas e típicas para cada bebida. Estas relações, tem como objetivo a elucidação da origem, falsificação e identidade das bebidas alcoólicas, não se aplicando à avaliação da qualidade das mesmas. (OLIVEIRA,2001) A legislação permite adições de quantidades específicas de álcool para cada bebida.

4.6 Balanço de massas

Na Figura 13 está apresentado um balanço de massa do processo piloto com indicações das concentrações dos diversos componentes e rendimento global do processo.

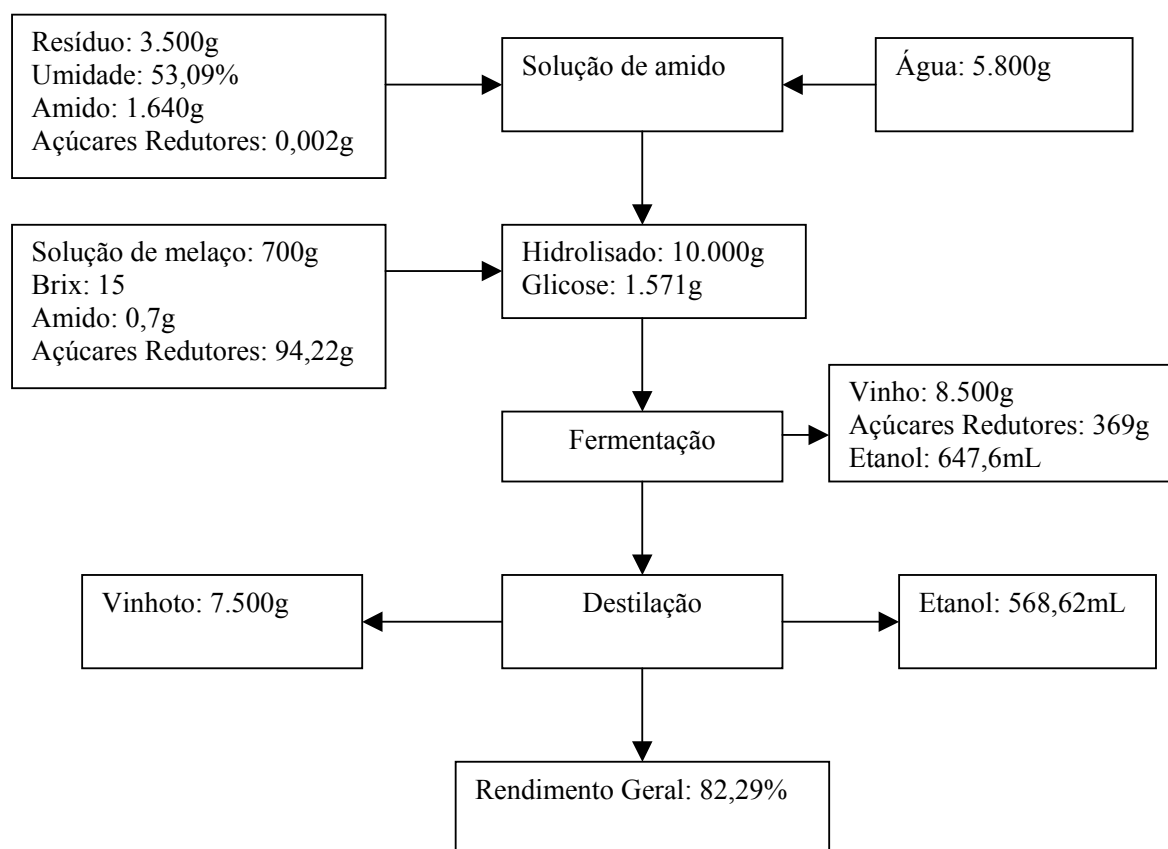


Figura 13 - Diagrama indicativo do balanço de massas do processo piloto.

No balaço de massas observou-se a formação de 1571g de glicose durante o processo de hidrólise enzimática, obtendo um rendimento de 87,68% de açúcares fermentescíveis em relação à concentração originária de amido e sacarose adicionados ao processo. A perda de água durante o processo de hidrólise foi corrigida, mantendo o volume hidrolisado até o processo de fermentação.

Ao final do processo fermentativo obteve-se 647,6mL de etanol no volume de vinho produzido. Considerando como referencial a conversão de glicose em etanol teórica de 51,1%, observa-se um rendimento de 82,42% deste valor no processo aqui realizado.

Após o processo de destilação a quantidade de etanol obtida foi em torno de 568,62mL, resultando num rendimento global do processo piloto de 72,2% considerando o referencial teórico de conversão de glicose a etanol.

5 CONCLUSÕES

A utilização dos resíduos da agroindustrialização da mandioca como fonte de carbono para fermentação alcoólica, avaliada neste trabalho mostrou-se adequada na produção de um etanol com qualidades requeridas para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.

No álcool etílico de resíduo amiláceo destilado, observou-se ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol, e ácidos orgânicos. Dentre os aldeídos identificados estão o furfuraldeído e o formaldeído com concentrações de 0,01 e 0,004mg/mL respectivamente.

O álcool de resíduo amiláceo apresentou concentração isotópica de 97% do tipo C3 e outros 3% do tipo C4.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHM, T. E., KRISHNASWAMY, C., RAMAKRISHNA, S. V. Effect of hydrolysis conditions of cassava on the oligosaccharide profile and alcohol fermentation. **Starch Stärke**, v.39, p.237 -40, 1987.

BELLUCO, A.E.S, **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes**. 2001. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2001.

BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A G. H.;PIGGOT, J.R. **Fermented Beverage Productions**. 1ed. London: Blackie academic & professional, 1995. Cap. 2, p. 33-44

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v.69, p.60-78, 1991.

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

CABELLO, C. ; OLIVEIRA, M.A; LEONEL, M. Caracterização dos resíduos amiláceos de diferentes agroindústrias de processamento de mandioca instaladas numa micro-região do

estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: UFRGS.

CARDOSO, C.E.L., **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. 2003. 207p. Tese (Doutorado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2003.

CEREDA, M. P. **Consumo alimentar e industrialização da mandioca no Brasil**. 144p. 1983, mimeo.

CERADA, M.P. (COORD); FIORATTO, A.M.C., et al. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo. Fundação Cargil, 2001. VIV Sérir: culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. p. 320.

CETESB. **Caracterização de efluentes de indústria de farinha de mandioca**. São Paulo, 53p., 1994, mimeo.

CIACCO, C.E., D'APPOLONIA, B.L. Functional properties of composite flours containing tuber flour or starch. **Baker's Dig**, v.51, n.5, p.46-50, 1977.

COPERSUCAR. **Fermentação**. São Paulo: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987.v. 1, cap. 10, p311 - 88.

DANDÃO, F. Alimento amazônico com alto valor protéico. Disponível em http://www2.uol.com.br/pagina20/5maio2003/site/25052003/c_042505.htm. acesso em 20 set.2004.

DEL BIANCHI, V.L **Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo**. Botucatu, 1998. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu/UNESP, 118p.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu, 184p, 2004, impresso.

EMBRATER. **Casa- de- farinha**. Brasília. Manual técnico. 63p. 1983.

FORGARTY, W. M., "Microbial Amylases", in **Microbial Enzymes and Biotechnology**, 1-92, Ed. by Fogarty W.M., Applied Science Publishers, 1983

FUJII, M. , HOMMA, T. , TANIGUCHI, M. Synergism of α - amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnol. Bioeng.** , v. 32, p. 910 - 15, 1988.

GALLIARD, D. J., BOWLER, P. Morphology and composition of starch. In: GALLIARD, D. T., ed. **Starch properties and potential**. Chichester: Willey, 1987. p.55-78.

GRAEL, E. T., MENEZES, T. J. B. Produção de α -amilase: características morfofisiológicas de *B. amyloliquefaciens* visando melhoramento genético. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.**, v.19, n. 1, p.70-6, 1989.

HORII, J. Problemas especiais de fermentação alcoólica. **Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo**. Soc. Bras. Microbiol., p. 70 - 4, 1978.

LABIANCA, D.A Acetaldehyde syndrome and alcoholism. **Analyst**, v.47,p.21,1974.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.41, n.1, p.90-103, 1990.

LEHTONEM, M.; JOURNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983.p.64-78.

LEONEL, M., CEREDA, M.P. Avaliação técnico-econômica da produção de etanol de farelo de mandioca utilizando pectinase como enzima complementar. **Energia na Agricultura**. v.13, n.2, p.1-14, 1998.

LIMA, U. A; BASSO, L.C; AMORIN, H.V. Produção de etanol . In: **Biotecnologia**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 1- 43.

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

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZONI, W. ; SCHIMIDELL, W. Porcessos Fermentativos In : **Biotecnologia Industrial Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 90-122.

LLOYD,N.E.,NELSON,W.J. Glucose and fructose containingssweetners fron starch. In: WHISTLER,R, BEMILLER, J.N., PASCHALL,E.F. **Starch Chemistry and Tecnology**, 2°ed. Orlando: Academic Press, 1984.p.611-60

LOPES, C. H. **Glossário de termos técnicos para a indústria sucro - alcooleira**. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Álcool, 1986. 32p.

LISLE, D.B.; RICHARDS, C.P.;WARDLEWORTH, D.F. The identification of distilled alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.84,p.93-96, 1978.

MAIA, A B. R. A. **1° Curso AMPAQ de produção artesanal de aguardente de qualidade**. Belo horizonte, 1995. 106p (apostila).

MARC, A., ENGASSER, J.M., MOLL, M., FLAYEUX, R. A kinetics model of Starch hydrolysis by alfa and beta amylase during mashing. **Biotechnology Bioeng.**, v.25, p. 481-496, 1983.

MERCIER, C. Les enzymes amylolytiques - Dans hydrolases et dépolymérases. **Enzymes d'intérêt industriel**, A Mouranche et C Costes Ed., Paris, France, Gauthier-Villars Bordas, 109-142, 1985.

NAJAFPOUR, D.G., SHAN, C.P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresourse Technology**, v.86, p. 91-94, 2003.

NASCIMENTO, R.F., CERRONI,J.L., CARDOSO, D.R. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v.18(3), p.350-355, 1998.

NASCIMENTO, R.F.; MARQUES, J.C.; NETO, B.S.L.; KEUKELEIRE, D.;FRANCO, D.W. Qualitative and quanitative hight-performace liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, 782, p13-23, 1997.

NORMANHA, E. S. **Derivados da mandioca: terminologia e conceitos**. Fundação Cargil, campinhas, 1982. 56p

NOVAES, F.V.;STUPIELLO,J.P.;OLIVEIRA,E.R.;VALSECHI, O. **I Curso de Extensão em Tecnologia de Aguardente de Cana**. Piracicaba, 1974.104p (apostila).

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.37, n.1, p. 84-96, 1986.

NYKÄNEN, L. & NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In MAARSE, H. (Ed.) **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 548 – 580.

OLIVEIRA, E. S. de. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 56 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

RASOVSKY, E. M. **Álcool : Destilarias**. Rio de Janeiro: Divulgação do MIC Instituto do Açúcar e do Alcool, 1973.p. 6-7.(Coleção Canavieira, 12)

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

RICHARD,J.E., ASAOKA, M., BLANSHARD,J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Sci.**,v.31,p.189-207,1991.

ROBYT J.F., "Enzymes in the Hydrolysis and Synthesis of Starch", in Starch : chemistry and technologie, 87-123, Ed. by Whister R. L. and Bemiller J. N. and Paschall E. F., Academic press, 1984

RIJKE, R. de; HEIDE, R. Flavour compounds in rum, cognac and whisky. In: PIGGOTT,J.R. (Ed.) **Flavour of distilled beverages: Origin and development**. Florida: Verlag Chemie International, INC., 1983. p.79-92. (Ellis Horwood series in food science and technology)

REED, G.,NAGODAWITHANA,T. W. **Yeast technology**. New York: An avi Book Published by Nostrand Reinhold, 1991. cap.5, p. 225-259: Distiller`s yeasts.

RUSSEL, I.; JONES, R.; GRAHAM, G., STEWART, G.G. **Yeast** - The primary Industrial microorganism. In: STEWART, G.G ;RUSSEL, I.; KLEIN, R.; HIEBSCH,R. Biological resarch on industrial yeast. v.1, CRC Press, Inc., 1987.

SMEDT, P.,LIDDLE, P. Differentiation between runs and other spirits. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v. 24, p. 269-286, 1975.

SURMELY, R. H.; ALVAREZ, H. **Hidrolisados de amido no Brasil e sua produção**. Botucatu; Centro de Raízes Tropicais, 1997. 49p.

SUOMALAINEN, H; LEHTONEM, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p.149 - 156, 1979.

SUOMALAINEN,H.;NYKANEN,L.;ERIKSSON,K. Composition and consumption of alcoholic beverages – a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 25, n.4,p.179-187, 1974.

TAKAHASHI, M., FAGGIOTTO. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA,7. Londrina - PR, 1992. **Anais...**, p.18, Londrina - PR, 1992.

VILELA, E.R.; FERREIRA, M.E. Tecnologia de produção e utilização do amido de mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 13 (145) : 69-74, 1987.