



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Flávia de Aquino Cutrim Farias

Caracterização estrutural e físico-química do amido de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) e potencial aplicação na produção de etanol

São José do Rio Preto-SP

2017

Flávia de Aquino Cutrim Farias

Caracterização estrutural e físico-química do amido de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) e potencial aplicação na produção de etanol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Célia Maria Landi Franco

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kiany Sirley Brandão Cavalcante

São José do Rio Preto-SP

2017

Farias, Flávia de Aquino Cutrim.

Caracterização estrutural e físico-química do amido de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) e potencial aplicação na produção de etanol / Flávia de Aquino Cutrim Farias. -- São José do Rio Preto, 2017

116 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Célia Maria Landi Franco

Coorientador: Kiany Sirley Brandão Cavalcante

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amido de Taioba. 3. Fermentação. 4. Etanol.  
5. Gelatinização. 6. Hidrolisados. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Flávia de Aquino Cutrim Farias

Caracterização estrutural e físico-química do amido de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) e potencial aplicação na produção de etanol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva  
UNESP-São José do Rio Preto, SP  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracema Oliveira Moraes  
Diretora Presidente da PROBIOM-Campinas, SP

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli  
UFSCar-Universidade Federal de São Carlos, SP

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del-Bianchi  
UNESP-São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho  
UNESP-São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto

29 de Junho de 2017

Dedico este trabalho

Aos meus pais Elizete e Henock Cutrim (*in memoriam*) pela minha formação e meu caráter. À minha filha Maria Eduarda Cutrim e esposo José Neto pelo apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus todo-poderoso pela dádiva divina da vida, por me fortalecer e amar na caminhada de todos os dias.

Aos meus pais Elizete (*in memoriam*) e Henock (*in memoriam*) que sempre acreditaram e investiram nos meus estudos, pelo amor e dedicação, nunca esquecerei.

À minha filha amada Maria Eduarda, melhor presente que Deus me deu e meu marido José Neto, pelo companherismo, amor, dedicação e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos meus irmãos Adriana, Marisete e Fernando, meus sobrinhos Elizandra, Sérgio Filho, Gabrielle e Fernando Filho pelo apoio.

Ao meu orientador professor Dr. Roberto da Silva pela confiança, conhecimentos transmitidos e ajuda em todos os momentos.

Às minhas co-orientadoras professoras Dr<sup>a</sup> Célia Maria Landi Franco e Dr<sup>a</sup> Kiany Sirley Brandão Cavalcante pela ajuda e sugestões que enriqueceram meu trabalho e minha vida profissional.

Aos amigos que conquistei nessa jornada e que me ajudaram com a pesquisa, como Mariana Costa, Márcia Morreti, Sidney Bordignon, Iasnaia Tavares e Suzane Martins por serem fundamentais em todos os momentos.

Aos companheiros de laboratório da Unesp, Jéssica, Flávia Villas-Boas, Vivian, Tatiane, Josiane Pereira, Pedro Lucas, Diego, Isabel, Carol, Erick Galindo, Janaina, Maite, Vanessa, Leida e Ana por toda ajuda e companheirismo.

Aos professores da Unesp, Dr. Roger Darros Barbosa, Dr. Vanildo Luiz Del-Bianchi, Dr. José Francisco Lopes Filho, Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Mauro, Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Conti e Silva, Dr<sup>a</sup> Natália Soares Janzantti, Dr<sup>a</sup> Neuza Jorge, Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Barreto Penna pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários Alana, Luiz, Ginaldo, Suely, Alex e Silvia pela disponibilidade e empenho quando solicitados.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Instituto Federal de Educação do Maranhão que colaboraram de forma direta e indireta para a realização deste sonho.

À CAPES pelo convênio firmado entre a Unesp e o IFMA, e o financiamento do projetos e a bolsa recebida por meio do DINTER 557/2013/processo nº 23038.009144/2012-41.

*"A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro."*

*Albert Einstein*

## Resumo

Há um grande interesse em se produzir álcool por matérias-primas alternativas à cana-de-açúcar. As fontes amiláceas tropicais são alvos potenciais nestas pesquisas. A taioba é uma planta que contém um teor considerável de amido nos seus tubérculos, mas é pouco explorada científica e comercialmente. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial industrial da taioba. Para isto, determinaram-se as características estruturais e físico-químicas do amido de taioba, e, em seguida, se avaliou o potencial para a produção de etanol. Todas as análises foram realizadas em comparação ao amido de mandioca, por ser uma fonte conhecida e bem difundida no Brasil. Os amidos apresentaram alto grau de pureza e baixo teor de fósforo ( $< 0,05\%$ ). O amido de taioba apresentou 21,80 % de amilose aparente e 16,96 % de amilose absoluta. Os amidos exibiram perda de água (sinérese) durante a estocagem em todas as temperaturas testadas, mas a menor porcentagem de perda em ambos os amidos foi a 25 °C. O amido de taioba apresentou temperaturas de gelatinização mais elevadas, maiores alterações de entalpia de gelatinização e maiores porcentagens de retrogradação, mas com valores de hidrólise menores que o amido de mandioca, sendo que essas diferenças podem ser atribuídas à menor proporção de cadeias ramificadas curtas (DP 6-12) da amilopectina e à maior viscosidade final do amido de taioba. O amido de taioba foi sacarificado enzimaticamente e submetido à fermentação usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1. A concentração máxima de etanol produzida foi de aproximadamente de 56,34 e 48,38 g.L<sup>-1</sup>, com produtividade de 0,67 e 0,56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e rendimentos na faixa de 0,49 e 0,46 para os hidrolisados de mandioca e taioba, respectivamente. A eficiência de conversão em álcool dos hidrolisados de mandioca foi de 96,8 % e taioba de 89,57 %. Este estudo obteve resultados inéditos e úteis para avaliar o emprego de tubérculo de taioba para desenvolvimento de produtos de valor agregado destinados a alimentos e combustível.

**Palavras-chaves:** gelatinização, retrogradação, fermentação, hidrolisados

## Abstract

There is a great interest in producing alcohol for raw materials that are alternative to sugarcane. Tropical amylaceous sources are potential targets in these surveys. Tannia is a plant that contains a considerable amount of starch in its tubers, but is little explored scientifically and commercially. This work aimed to evaluate the industrial potential of this plant. For this, the structural and physicochemical characteristics of the tannia starch were determined, and then the potential for the production of ethanol was evaluated. All the analyzes were carried out in comparison to cassava starch, because it is a known and well-known source in Brazil. The starches presented high purity and low phosphorus content (<0.05%). Tannia starch had 21.80% apparent amylose and 16.96% absolute amylose. Starches exhibited loss of water (syneresis) during storage at all temperatures tested, but the lowest percentage loss in both starches was at 25 °C. Tannia starch showed higher gelatinization temperatures, greater gelatinization enthalpy changes and higher percentages of retrogradation, but with hydrolysis values lower than cassava starch, and these differences can be attributed to the lower proportion of short branched chains (DP 6-12) of the amylopectin and the higher final viscosity of the tannia starch. The tannia starch was saccharified enzymatically and subjected to fermentation using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* JP1. The maximum concentration of ethanol produced was approximately 56.34 and 48.38 g.L<sup>-1</sup>, with yields of 0.67 and 0.56 gL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and yields in the range of 0.49 and 0.46. For the cassava and tannia hydrolysates, respectively. The alcohol conversion efficiency of cassava hydrolysates was 96.8% and tannia 89.57%. This study has obtained unpublished and useful results to evaluate the use of tuber tubers for the development of value-added products for food and fuel.

**Keywords:** gelatinization, retrogradation, fermentation, hydrolysate

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> (A) Folhas (LIMA; KRUIPEK, 2016) e (B) tubérculos de taioba ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> ).....	3
<b>Figura 2:</b> Fluxograma do processo de obtenção dos amidos (LEONEL, 2007).....	8
<b>Figura 3:</b> Estrutura da amilose [polímero linear composto por D-glicoses unidas em $\alpha$ -(1-4)]. Adaptado de DENARDIN; SILVA (2009).....	9
<b>Figura 4:</b> Modelo para o complexo amilose-lipídeo, mostrando a inclusão da região alifática do ácido graxo no interior da hélice de amilose (BULÉON et al., 1998).....	10
<b>Figura 5:</b> Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em $\alpha$ -(1-4) e $\alpha$ -(1-6)]. Adaptado de DENARDIN; SILVA (2009).....	11
<b>Figura 6:</b> Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. Adaptado de PARKER; RING (2001).....	12
<b>Figura 7:</b> Configuração da estrutura cristalina tipo A e B (BULÉON et al., 1998).....	14
<b>Figura 8:</b> Difractogramas de Rx mostrando os tipos A, B e Vh. Adaptado por Franco et al. (2001).....	15
<b>Figura 9:</b> Hidrólise enzimática industrial de amido em glicose e padrão de ação de enzimas amilolíticas. $\alpha$ : $\alpha$ -amilase; G: glucosidase; D: enzima desramificante (pululanase); O: resíduo $\alpha$ -D-glucose não redutor (Lévêque et al., 2000).....	25
<b>Figura 10:</b> Via metabólica da fermentação do etanol em <i>S. cerevisiae</i> . Abreviaturas: HK: hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfogliceromutase ENO: enolase PYK: Piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).....	28
<b>Figura 11:</b> Fluxograma de isolamento do amido de taioba.....	32
<b>Figura 12:</b> Meio sacarificado em estufa sob agitação acoplados a válvulas de anaerobiose.....	42
<b>Figura 13:</b> Perfil de distribuição do diâmetro granular do amido de taioba. A: diâmetro menor; B: diâmetro maior.....	47
<b>Figura 14:</b> Perfil de distribuição do diâmetro granular do amido de mandioca. A: diâmetro menor; B: diâmetro maior.....	48
<b>Figura 15:</b> Micrografias dos grânulos de amido de Taioba (A1 = 5000 x; A2 = 1000 x ; A3 = 500 x) e Mandioca (B1 = 5000 x; B2 = 1000 x; B3 = 500 x) observados em microscópio eletrônico de varredura.....	49
<b>Figura 16:</b> Perfis de eluição dos amidos nativos de taioba e mandioca obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (○) carboidratos totais; (●) Blue value.....	51
<b>Figura 17:</b> Distribuição normalizada do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de taioba e mandioca desramificados com isoamilase, determinada por HPAEC-PAD.....	52

<b>Figura 18:</b> Difractogramas de raios-X dos amidos de taioba e mandioca.....	56
<b>Figura 19:</b> Perfil viscoamilográfico dos amidos de taioba e mandioca.....	58
<b>Figura 20:</b> Poder de inchamento dos amidos de taioba e mandioca.....	63
<b>Figura 21:</b> Índice de solubilidade dos amidos de taioba e mandioca.....	65
<b>Figura 22:</b> Sinérese em géis de amido de taioba e mandioca em função do tempo de estocagem condicionada a 25 °C (A), 4 °C (B) e a -18 °C (C).....	66
<b>Figura 23:</b> Efeito da variação do pH sobre a atividade da $\alpha$ -amilase (A) e amiloglucosidase (B) a 55 °C.....	68
<b>Figura 24:</b> Efeito da variação da temperatura máxima sobre a atividade da $\alpha$ -amilase (A) e amiloglucosidase (B) (pH 5,0).....	69
<b>Figura 25:</b> Estabilidade térmica das enzimas $\alpha$ -amilase (A) e amiloglucosidase (B). Incubação nas temperaturas de 50 a 90 °C, nos pH ótimos de cada enzima.....	70
<b>Figura 26:</b> Efeito da concentração de amido de mandioca nos valores de dextrose equivalente durante a liquefação com carga enzimática de 12 U/g (A) e 130 U/g (B), a 60 °C e pH de 5,5.....	71
<b>Figura 27:</b> Efeito no valor de dextrose equivalente durante a liquefação com as cargas enzimáticas de 12 U/g e 130 U/g na concentração de substrato de 20 %, a 60 °C e pH de 5,5.....	72
<b>Figura 28:</b> Sacarificação do amido liquefeito de mandioca por $\alpha$ -amilase na concentração de 12 U/g (A) e 130 U/g (B), a 65 °C e pH de 4,5.....	73
<b>Figura 29:</b> Hidrólise dos amidos de taioba e mandioca na concentração dos substratos a 20 % com 12 U/g de $\alpha$ -amilase, a 60 °C e pH de 5,5.....	74
<b>Figura 30:</b> Efeito do tempo de hidrólise na sacarificação dos amidos de taioba e mandioca, a 65 °C e pH de 4,5.....	76
<b>Figura 31:</b> Curva de produção de etanol durante 84 horas de fermentação a partir dos hidrolisados de taioba (A) e mandioca (B).....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição química dos amidos isolados.....	43
<b>Tabela 2</b> -Tamanho dos grânulos dos amidos de taioba e mandioca.....	45
<b>Tabela 3</b> - Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos.....	50
<b>Tabela 4</b> - Afinidade por iodo e teores de amilose aparente dos amidos de taioba e mandioca.....	52
<b>Tabela 5</b> - Propriedades de pasta dos amidos de taioba e mandioca.....	56
<b>Tabela 6</b> - Propriedades térmicas dos amidos de taioba e mandioca.....	58
<b>Tabela 7</b> - Propriedades de retrogradação dos amidos de taioba e mandioca.....	59
<b>Tabela 8</b> - Poder de inchamento dos amidos dos amidos de taioba e mandioca.....	61
<b>Tabela 9</b> - Índice de solubilidade dos amidos dos amidos de taioba e mandioca.....	63
<b>Tabela 10</b> - Dados da fermentação alcoólica dos hidrolisados de mandioca e taioba pela levedura industrial JP-1.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
g	Gramma
L	Litro
h	Horas
s	Segundos
min	Minutos
t	Toneladas
ha	Hectares
kg	Quilo
J	Joule
U	Unidade
bs	Base seca
mL	Mililitro
cm	Centrímetros
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
g	Gravitacional
rpm	Rotação por minuto
mM	Milimol
M	Molar
θ	Teta
RVA	Rápido Visco Analisador
DSC	Calorímetro Exploratório Diferencial
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido dinitrosalicílico
T <sub>o</sub>	Temperatura início
T <sub>p</sub>	Temperatura pico
T <sub>c</sub>	Temperatura conclusão
ΔH	Variação de entalpia
R	Retrogradação
ΔT	Variação de temperatura
GP	Grau de polimerização
DE	Dextrose equivalente
AMG	Amiloglucosidase
AMap	Amilose aparente
AMabs	Amilose absoluta
AIA	Afinidade por iodo do amido
AIA <sub>P</sub>	Afinidade por iodo da amilopectina isolada
P <sub>0</sub>	Produto inicial
P <sub>f</sub>	Produto final
S <sub>0</sub>	Substrato inicial
S <sub>f</sub>	Substrato final

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.OBEJTIVO GERAL.....</b>	<b>2</b>
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
3.1 TAIOBA( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> ).....	3
<b>3.1.1 Cultivo.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.2 Características nutricionais.....</b>	<b>5</b>
3.2 AMIDO.....	6
<b>3.2.1 Amilose.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.2 Amilopectina.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3 Estrutura cristalina.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.4 Morfologia dos grânulos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.5 Constituintes menores.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.6 Propriedades funcionais do amido.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.6.1 Gelatinização e retrogradação.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.6.2 Poder de inchamento e Solubilidade.....</b>	<b>19</b>
3.3 BIOETANOL.....	20
3.4 HIDRÓLISE DO AMIDO.....	22
3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. MATERIAIS.....	30
4.2. MÉTODOS.....	31
<b>4.2.1. Isolamento dos amidos.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2 Caracterização do amido de taioba.....</b>	<b>32</b>

4.2.2.1 Composição química dos amidos.....	32
4.2.2.2 Forma e distribuição de tamanho de grânulos dos amidos.....	32
4.2.2.3 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos de taioba e mandioca por cromatografia de permeação em gel (GPC).....	33
4.2.2.4 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina.....	33
4.2.2.4.1 <i>Desramificação dos amidos</i> .....	34
4.2.2.4.2 <i>Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada(HPAEC-PAD)</i> .....	34
4.2.2.5 Teor de amilose.....	35
4.2.2.5.1 Isolamento da amilopectina.....	35
4.2.2.5.2 Determinação dos teores de amilose aparente e absoluto.....	35
4.2.2.6 Difração de raios-X e cristalinidade relativa.....	36
4.2.2.7 Propriedades de pasta.....	37
4.2.2.8 Propriedades de gelatinização e retrogradação dos amidos.....	37
4.2.2.9 Poder de Inchamento (PI) e Índice de Solubilidade (IS).....	38
4.2.2.10 Sinérese.....	38
<b>4.2.3 Caracterização parcial das enzimas comerciais <math>\alpha</math>-amilase e amiloglicosidase.....</b>	<b>39</b>
4.2.3.1 Determinação da atividade enzimática.....	39
4.2.3.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas.....	39
4.2.3.3 Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	39
4.2.3.4 Estabilidade térmica.....	39
<b>4.2.4 Produção de etanol.....</b>	<b>40</b>
4.2.4.1 Pré-teste de hidrólise.....	40
4.2.4.2 Hidrólise enzimática.....	41
4.2.4.2.1 <i>Liquefação</i> .....	41
4.2.4.2.2 <i>Sacarificação</i> .....	41

4.2.4.3 Preparo do inóculo.....	41
4.2.4.4 Fermentação.....	42
<b>4.3 Análise estatística.....</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS.....</b>	<b>44</b>
5.1.1. Composição química dos amidos.....	44
5.1.2. Forma e distribuição de tamanho de grânulos dos amidos.....	46
5.1.3 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos de taioba e mandioca por cromatografia de permeação em gel (GPC).....	50
5.1.4 Distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos.....	51
5.1.5 Afinidade por iodo e teor de amilose aparente e absoluto.....	54
5.1.6 Difração de raios-X e cristalinidade relativa.....	55
5.1.7 Propriedades de Pasta.....	57
5.1.8 Propriedades térmicas.....	60
5.1.9 Poder de Inchamento (PI) e Índice de Solubilidade (IS).....	62
5.1.10 Sinérese.....	66
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS COMERCIAIS <math>\alpha</math>-AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE.....</b>	<b>68</b>
5.2.1 Efeito do pH, temperatura e estabilidade térmica sobre a atividade das enzimas.....	68
<b>5.3 PRODUÇÃO DE ETANOL.....</b>	<b>70</b>
5.3.1 Pré-teste da hidrólise do amido de mandioca.....	70
5.3.2 Hidrólise enzimática dos amidos.....	73
5.3.3 Fermentação dos hidrolisados.....	77
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os esforços em pesquisa e desenvolvimento em energias alternativas aumentaram significativamente nos últimos anos visando atender às crescentes demandas de necessidades energéticas. O bioetanol é uma das alternativas mais promissoras aos combustíveis fósseis, porque pode ser produzido a partir de várias fontes renováveis ricas em carboidratos. Entre as fontes pesquisadas, a cana-de-açúcar no Brasil e o grão de milho nos Estados Unidos são as principais matérias-primas para a produção de bioetanol (LEE et al, 2012; ZABED et al., 2017).

Embora a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil seja um processo consolidado e bem sucedido, o país possui grande variedade de fontes botânicas amiláceas ricas em amido, como tubérculos e rizomas, muitos deles pouco estudados. Estas matérias-primas detêm um potencial notável para atender a demanda futura de energia, tanto pelas suas altas produtividade/hectare, quanto por não serem extensivamente usados para alimentação e, portanto, não afetarem o fornecimento de alimentos para os seres humanos (BARCELOS et al., 2011; JAGATEE et al., 2015).

O amido é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. As aplicações de amidos são, entretanto, dependentes de suas características físico-químicas e funcionais que estão diretamente relacionadas às características estruturais do grânulo, as quais dependem da fonte botânica. Os grânulos de amido são misturas heterogêneas de duas macromoléculas, amilose e amilopectina, que diferem no tamanho molecular e grau de ramificação. A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de glicose ligadas em  $\alpha$ -1,4, apresentando pequeno número de ramificações, enquanto a amilopectina é uma molécula altamente ramificada, também composta de unidades de glicose ligadas em  $\alpha$ -1,4, mas com 5 a 6% de ligações  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação. A compreensão da estrutura e características dos grânulos de amido é importante para a determinação do comportamento e aplicabilidade do amido. Dentre as propriedades mais importantes, destacam-se: tamanho, forma e estrutura dos grânulos, capacidade de gelatinização e retrogradação, proporção de amilose e amilopectina e cristalinidade (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004; YONEMOTO; CALORI-DOMINGUE; FRANCO, 2007).

A taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) é uma hortaliça folhosa originária das regiões tropicais da América do Sul, que se desenvolve principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e seu consumo pode ser tanto das folhas quanto dos tubérculos. Os tubérculos

apresentam elevada produtividade agrícola (30 t/ha) que, aliado ao teor de amido (20-30% da matéria seca), a habilita como potencial matéria-prima para produção de bioetanol (SEGANFREDO et al., 2001; LEONEL, 2007). Além disso, até o momento não existem relatos na literatura sobre a estrutura e propriedades do amido de taioba e seu emprego na produção de bioetanol.

A obtenção de bioetanol a partir de materiais amiláceos envolve, tipicamente três etapas, a liquefação por  $\alpha$ -amilases, a sacarificação por amiloglicosidases e a fermentação da glicose por leveduras até o bioetanol. O estudo da taioba como matéria-prima para produção de bioetanol poderia ser um reforço na economia rural com geração de emprego e renda, bem como ampliar a oferta de fontes alternativas de geração de energia necessárias para garantir a sustentabilidade da indústria de bioetanol brasileiro. Por essa razão, o principal objetivo deste trabalho foi estudar, em comparação à mandioca, as características estruturais e físico-químicas do amido de taioba, a sua hidrólise com enzimas comerciais e a sua posterior fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* JP1 para produção de bioetanol. Este estudo apresenta resultados inéditos e úteis para avaliar o emprego dos tubérculos de taioba para desenvolvimento de produtos de valor agregado destinados a alimentos e combustível.

## **2.OBJETIVO GERAL**

O objetivo desse trabalho foi estudar a caracterização estrutural e físico-química do amido nativo de taioba e compará-las com aquelas da mandioca, além de avaliar o potencial produção de etanol a partir do amido de taioba.

### **2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar a estrutura e as propriedades físico-químicas do amido de taioba e compará-las com aquelas do amido da mandioca;
- Avaliar o pH ótimo, a temperatura ótima e a estabilidade térmica das enzimas comerciais  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase;

- Avaliar a produção de etanol do amido de taioba utilizando enzimas comerciais.

### 3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1.TAIOBA (*Xanthosoma sagittifolium*)

A espécie *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, originária das regiões tropicais da América do Sul, popularmente conhecida como taioba, taio, tania ou taiá, é uma monocotiledônea, pertencente à família Araceae, considerada hortaliça folhosa, herbácea rizomatosa, perene e robusta, podendo atingir altura de 1 a 2 m. A planta possui folhas com limbos grandes, carnosos, cerosos e com nervuras marcantes (SEGANFREDO et al., 2001; CAMILI et al., 2013).

É provável que as Antilhas e a América Central tenham desempenhado papel primordial na seleção e dispersão de espécies e variedades cultivadas, sendo a primeira denotação da espécie cultivada descrita como *Xanthosoma sagittifolium*. No entanto, existem outras espécies de *Xanthosoma* que são utilizadas como fonte de alimento, como *Xanthosoma maffafa* cultivadas na África e *Xanthosoma robustum* na Flórida. No Brasil, destacam-se a *Xanthosoma violaceum* (taioba roxa) e a *Xanthosoma sagittifolium* (taioba comum). Normalmente, as espécies *Xanthosoma* são discutidas juntamente com o taro (*Colocasia esculenta*) ou mesmo confundidas com esta cultura (GOMES et al., 2014). As principais diferenças que as distinguem das plantas da mesma família são as folhas da taioba com formato sagitado com linha contornando toda sua borda e as folhas fundem-se exatamente no talo, com seiva de aparência esbranquiçada (Figura 1) (LIMA; KRUPPEK, 2016).



**Figura 1:** (A) Folhas (LIMA; KRUPPEK, 2016) e (B) tubérculos de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*).

Os órgãos subterrâneos destas plantas tropicais que pertencem à família Araceae armazenam alta concentração de amido que varia entre 22 e 40% e, por esta razão, eles são considerados alimentos ricos em carboidratos (LAWAL, 2004; PÉREZ; SCHULTZ; DELAHAYE, 2005). Tal como a batata (*Solanum tuberosum*) e a mandioca (*Manihot esculenta*), o teor de sólidos presentes nos órgãos de armazenamento subterrâneos é principalmente o amido (PÉREZ; BREENE; BAHNASSEY, 1998).

### 3.1.1 Cultivo

O cultivo de taioba é difundido em diversos continentes, sendo a planta mais intensamente cultivada e consumida nos países da América Central, África e Ásia, havendo inclusive registros de seu cultivo em ruínas peruanas. Em alguns países da África, o cultivo é consorciado com palmeiras oleíferas, como o dendê, aproveitando seu denso sombreamento (NISHANTHINI; MOHAN, 2012; LIMA; KRUPK, 2016). Estudos comprovam a viabilidade de se associar a alface (*Lactuca sativa*) com a taioba (*Xanthosoma sagittifolium*), respeitando-se o arranjo das plantas na área (espaçamento) e o estágio de desenvolvimento das culturas (CAMILI et al., 2013).

No Brasil, a taioba tem sido cultivada por pequenos produtores, visando principalmente a produção de folhas para consumo em pratos típicos ou ração animal (SEGANFREDO et al., 2001). Embora seja espécie nativa e tradicional da cultura brasileira, a taioba faz parte do grupo de hortaliças não convencionais, além de ser comercialmente pouco explorada (SANTOS et al., 2014).

A taioba ainda não possui variedades que se aclimatem facilmente em solo seco ou mesmo ao frio, embora sua propagação geográfica seja bastante intensa. Para seu perfeito desenvolvimento requer solo sempre úmido e clima bastante quente. Apresenta bom desempenho de produção no período de verão chuvoso, quando as hortaliças folhosas convencionais, como couve e alface, têm dificuldades de cultivo (SEGANFREDO et al., 2001). Essa espécie apresenta como características a rusticidade, boa adaptação a altas temperaturas e solos com alta umidade, além de apresentar elevada produção de folhas e tubérculos por unidade de área, sendo considerada uma cultura típica de subsistência. Os tubérculos podem ser utilizados na alimentação ou comercialização, aumentando a renda com a cultura (SANTOS et al., 2014).

No Brasil, o seu ciclo completo (plantio à colheita) leva cerca de 4 a 5 meses, o que difere de outros países, onde a taioba amadurece aos 10 meses. Dependendo da região de cultivo no Brasil, a produção de folhas varia de 10 a 25 t/ha durante o período de colheita (MANGAN et al., 2008).

Os tubérculos apresentam elevada produtividade agrícola (15-40 t/ha) que, aliado ao teor de amido (24 % em base seca) e rendimento potencial de amido (3,70-9,88 t/ha), possibilitaria o processamento dessa tuberosa como matéria-prima amilácea (GARCIA; LEONEL, 2005).

A propagação convencional da taioba é exclusivamente vegetativa. A espécie possui um tubérculo central rodeado por pequenas ramificações laterais que representam os órgãos propagativos da cultura (SANTOS et al., 2014; SOUZA; FINGER, 2014). A floração é esporádica e quando ocorre, produz poucas sementes viáveis. Acredita-se que em locais onde se cultivou taioba, depois de um longo tempo de retirada dos tubérculos, apareçam plântulas, supondo-se que sua origem seja, portanto, de sementes (MANGAN et al., 2008; SOUZA; FINGER, 2014).

### **3.1.2 Características nutricionais**

A importância da taioba como componente da dieta humana está no fato de seu total aproveitamento (folhas e tubérculos), além do baixo custo de produção, facilidade de plantio e resistência à ação de pragas e doenças, o que facilita a obtenção dessa hortaliça em muitas regiões brasileiras, sendo considerada cultura típica de subsistência. As folhas de taioba merecem destaque em relação ao potencial nutricional, cujas grandes folhas são fontes de vitamina A e C, além dos minerais cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco e potássio. Alguns destes nutrientes aparecem frequentemente na lista de deficiências alimentares da população brasileira (MORAIS et al., 2006; CAMILI et al., 2013; GOMES et al., 2014).

Os tubérculos da taioba contêm 20-30 % de amido e 1-4 % de proteínas, estão entre as estruturas tuberosas comestíveis mais ricas em proteínas, se comparado, por exemplo, à mandioca, e são consumidos na forma de purês, cozidos ou mesmo assados, em diversos países da África, América Central, América do Sul, Antilhas e China (SEGANFREDO et al., 2001; AKPAN; UMOH, 2004; LAWAL, 2004)

A presença de compostos anti-nutricionais (substâncias que podem interferir no processo de absorção de nutrientes), tais como: oxalato, inibidores de tripsina, inibidores de amilase,

alcaloides, glicosídeos, cianogênicos, saponinas, fitato e fenóis na taioba, em alguns casos, podem até não ser necessariamente tóxicos, mas ainda assim, reduz o potencial nutritivo das plantas ou impede que o organismo consiga absorvê-las, entretanto, o processo de cozimento demonstra-se como o mais eficaz para redução dessas substâncias (LIMA; KRUPPEK, 2016).

Quase todo cálcio presente é sob a forma de oxalato de cálcio que provocam irritabilidade, amargor e adstringência na boca e garganta. Na literatura não há relatos sobre variações nos teores de oxalato de cálcio nas folhas e nos tubérculos durante o seu desenvolvimento, tornando-se este um fator limitante do consumo alimentício da planta (SEGANFREDO et al., 2001; AKPAN; UMOH, 2004; LAWAL, 2004). Os motivos que levam ao baixo consumo da taioba seria a possibilidade da associação ao taro (*Colocasia esculenta*), cuja folha não é consumida para fins alimentícios. Assim como comparada à outra planta da mesma família botânica, a taioba-brava (*Colocasia antiquorum* Schott), cuja folha é bem parecida à da taioba comum, mas tem pecíolo e folha com coloração escura, próxima do arroxeadado, e propriedades tóxicas (GOMES et al., 2014).

Apesar de muitas publicações afirmarem que as folhas e tubérculos dessas espécies (*Xanthosoma sagittifolium* e *Colocasia esculenta*) podem ser consumidas, desde que passada por processo de cozimento, pois são capazes de reduzir as substâncias prejudiciais, há também informações populares, sem fundamento científico, que afirmam o contrário, o que leva a uma divergência de informações (LIMA; KRUPPEK, 2016).

A taioba também é importante do ponto de vista estratégico, pois pode garantir a segurança alimentar durante períodos de carência sazonal das culturas comerciais, como também pode crescer e produzir em ambiente sombreado e possível de se desenvolver em áreas de reflorestamento (MORAIS et al., 2006). No Brasil, o consumo dos tubérculos é reduzido, no entanto, há comércio regular das folhas, principalmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (SEGANFREDO et al., 2001; SOUZA; FINGER, 2014).

### 3.2 AMIDO

O amido é um polissacarídeo composto unicamente de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 (BULEÓN et al., 1998). É a principal forma de armazenamento de energia das plantas, estando presente nos órgãos de reserva como é o caso de

grãos em cereais (arroz, milho e trigo), tubérculos e raízes (batata, mandioca, taro) e leguminosas (feijão, ervilha, lentilha) (CIACCO; CRUZ, 1987; LEONEL; CEREDA, 2002).

O amido, estruturalmente, é formado por duas macromoléculas, a amilose e a amilopectina, sendo que a proporção e a organização destas moléculas estão diretamente relacionadas com as características funcionais do amido. Assim, a maior parte dos amidos contêm 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina, mas essas proporções variam com a fonte botânica do amido, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (JANE et al., 1999; DENARDIN; SILVA, 2009).

Nos grânulos de amido, a amilose e a amilopectina se apresentam de forma radial, ligadas entre si por ligações de hidrogênio formando uma estrutura semicristalina. A região cristalina dos grânulos de amido é composta pelas cadeias ramificadas da amilopectina enquanto que a amilose é dispersa na região amorfa (JACOBS et al., 1998; FRANCO et al., 2001; ASCHERI et al., 2014).

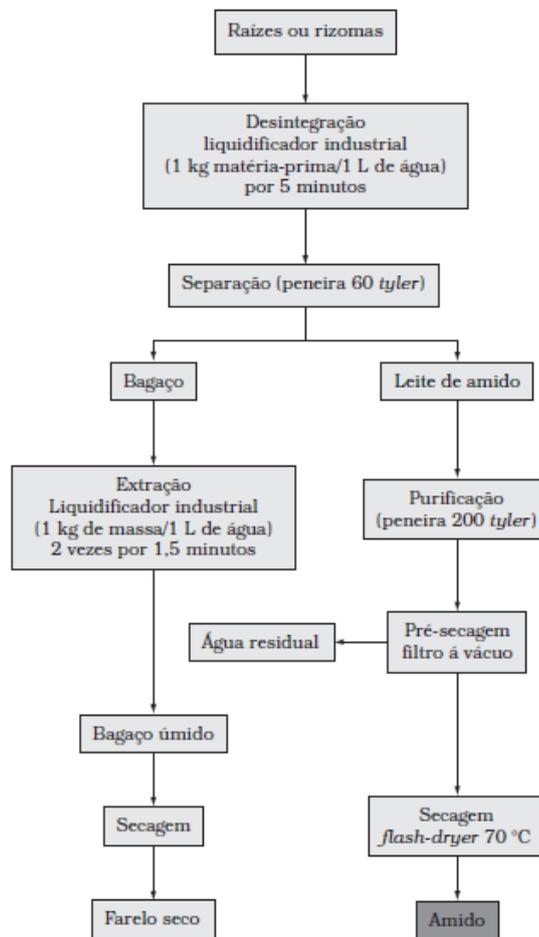
A organização dos polissacarídeos de amido em grânulos é exibida em diferentes níveis, desde o empacotamento de hélices duplas formadas a partir de amilose até os cachos agrupados das moléculas de amilopectina (HOYOS-LEYVA; BELLO-PEREZ; ALVAREZ-RAMIREZ, 2017). Desta forma, os diferentes padrões de ordenamentos entre as regiões cristalinas e amorfas são responsáveis pela birrefringência mostrando uma cruz de polarização bem definida (Cruz de Malta) quando os grânulos de amido são observados sob luz polarizada (FRANCO et al., 2001).

A utilização do amido nas indústrias alimentar e não alimentar depende das suas propriedades físicas, químicas e funcionais (FALADE; OKAFOR, 2013).

O amido contribui muito para as propriedades de textura de muitos alimentos e tem muitas aplicações industriais como espessante, estabilizante coloidal, gelificante, agente de volume, agente de retenção de água e adesivo. Interesse em novos produtos de maior valor agregado para a indústria resultou em muitos estudos sobre as propriedades morfológicas, reológicas, térmicas e texturais de amidos (SINGH et al., 2003).

No caso do amido de taioba, considerada uma fonte de amido que pode ser extraída e utilizada em diferentes indústrias, conhecendo essas características estruturais e funcionais, acaba se tornando competitiva com amidos comerciais, tais como milho, trigo e batata (PEREZ et al., 2005; FALADE; OKAFOR, 2013).

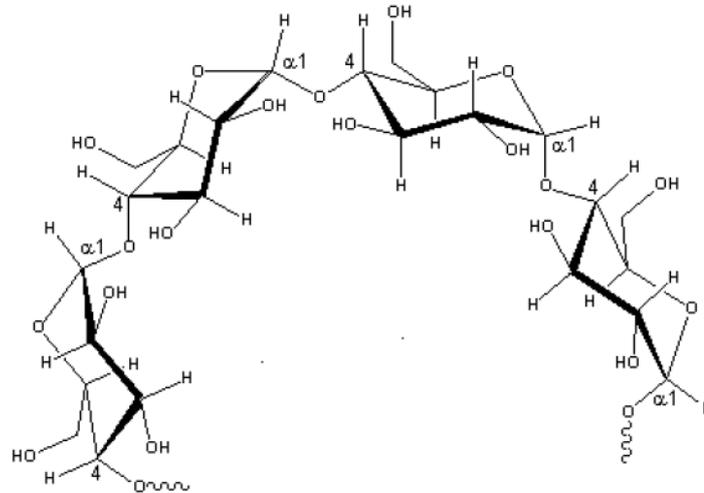
A extração do amido é uma maneira de conservar as características nutricionais da planta, pois se trata de um produto em pó, e o processamento envolve algumas etapas que são fundamentais para posterior caracterização e estocagem (Figura 2).



**Figura 2:** Fluxograma do processo de obtenção dos amidos. (LEONEL, 2007).

### 3.2.1 Amilose

A amilose é uma molécula essencialmente linear (Figura 3) formada por unidades de D-glicoses unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), contudo têm sido encontradas em sua estrutura algumas moléculas ramificadas em  $\alpha$  (1-6) (BULÉON et al., 1998). A amilose apresenta peso molecular de  $1,5 \times 10^5$ - $10^6$  e tamanho médio da cadeia de aproximadamente  $10^3$  unidades de glicose (BLENNOW et al., 2000; FRANCO et al., 2001).



**Figura 3:** Estrutura da amilose [polímero linear composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4)]. Adaptado de DENARDIN; SILVA (2009).

A molécula de amilose é capaz de formar estrutura helicoidal, formada por ligações de hidrogênio entre os radicais hidroxilas das moléculas de glicose. As hélices consistem em média por seis unidades de resíduo de glicose por volta e uma cavidade hidrofóbica (HOOVER, 2001).

O interior da hélice é lipofílico contendo predominantemente átomos de hidrogênio, e estes podem ser substituídos por moléculas de ácidos graxos e lisofosfolipídeos dando origem a um complexo amilose-lipídeos, enquanto que na parte externa da hélice encontram-se as hidroxilas (Figura 4) (MORRISON, 1995; TESTER, 1997).

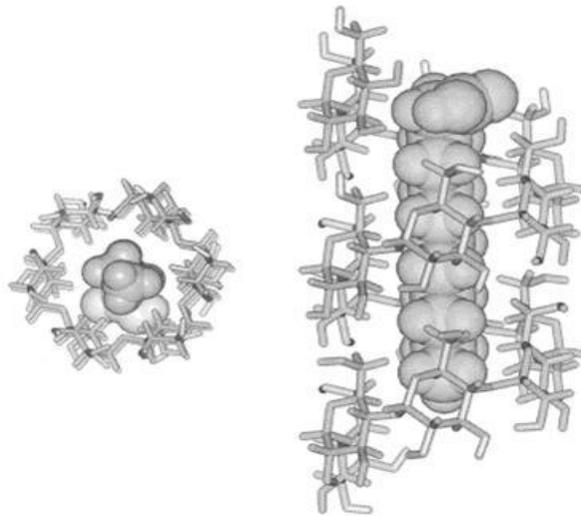
Os complexos amilose-lipídeos são insolúveis em água e requerem temperaturas mais elevadas para dissociar-se, podendo alterar as temperaturas de gelatinização do amido, a textura e o perfil da viscosidade da pasta, e limitando a retrogradação (SINGH et al., 2003).

As hélices de amilose formam complexos de indução com iodo dando uma cor azul, que há muito tem sido utilizada como um teste colorimétrico para amido. Embora seja rápido e conveniente, este método está sujeito a imprecisões porque o comprimento de onda da absorvância máxima dos complexos de amilose-iodo varia com grau de polimerização (GP) e a formação de complexos de amilopectina-iodo (COPELAND et al., 2009).

O teor de amilose varia de acordo com a maturidade e origem das plantas e a sua determinação pode ser afetada pelo tipo de metodologia e preparação da amostra, bem como pelo comprimento das cadeias laterais de amilopectina (se eles são demasiado longos também pode

absorver o iodo e superestimar o teor de amilose aparente) (JANE et al., 1999; FRANCO et al., 2002; YOO et al., 2009; ASCHERI et al., 2014).

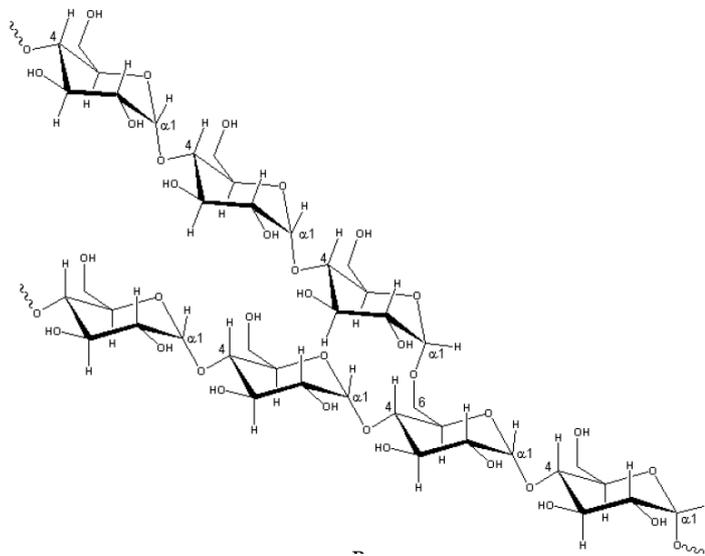
A localização e o estado de amilose dentro dos grânulos é uma das questões mais importantes a serem respondidas. O modelo mais aceito de localização de amilose em grânulos de amido é, de cadeias individuais orientadas radialmente, distribuídas aleatoriamente entre as cadeias radiais de amilopectina (PERÉZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).



**Figura 4:** Modelo para o complexo amilose-lipídeo, mostrando a inclusão da região alifática do ácido graxo no interior da hélice de amilose (BULÉON et al., 1998).

### 3.2.2 Amilopectina

A amilopectina contém principalmente cadeias curtas de unidades D-glicose com ligações  $\alpha$  (1-4), ela apresenta uma grande proporção de ramificações glicosídicas ( $\alpha$  1-6) com 5-6 % dessas ligações da molécula, criando uma estrutura altamente ramificada (Figura 5) (BULÉON, et al., 1998).



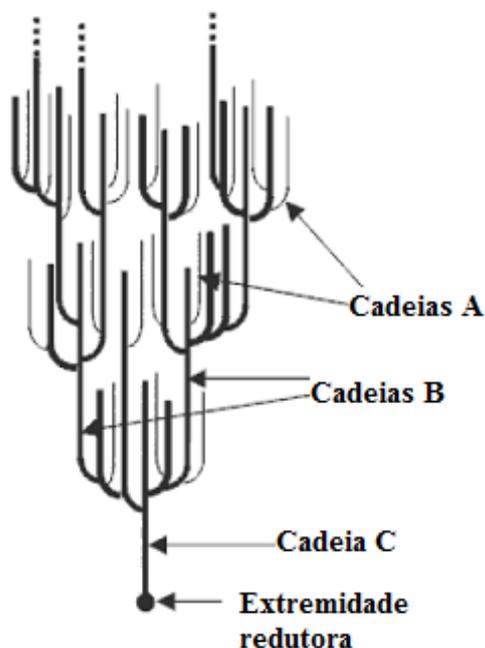
**Figura 5:** Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-6)]. Adaptado de DENARDIN; SILVA (2009).

Uma molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas denominadas cadeias A e B (Figura 6). As cadeias A são aquelas que são conectadas a outras cadeias via  $\alpha$  (1-6), mas não carregam qualquer ramificação. As cadeias do tipo B são compostas por glicoses ligadas em  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,6), contendo uma ou várias cadeias tipo A e podem conter cadeias tipo B unidas por meio de um grupo hidroxila primário (DENARDIN; SILVA, 2009; FRANCO et al., 2001).

As cadeias ramificadas de amilopectina são normalmente classificadas pelo grau de polimerização (GP) nos seguintes tipos: cadeia A (GP 6-12), cadeia B1 (GP 13-24), cadeia B2 (GP 25-36) e cadeias B3 + (GP  $\geq$  37) (LIN et al., 2016).

As cadeias A e B1 formam cachos (*clusters*) simples, são mais externas e organizadas em duplas hélices, enquanto B2, B3 e B4 se estendem em dois, três ou mais cachos. As cadeias C, que carregam o grupo redutor das moléculas, são muito semelhantes entre as fontes botânicas com variações de tamanhos entre 10 e 130 unidades de glicose, a maioria tendo por volta de 40 unidades (DENARDIN; SILVA, 2009).

O modelo amplamente aceito para a estrutura molecular da amilopectina é o modelo de *cluster* (cachos), onde os pontos de ramificação nas moléculas de amilopectina não são distribuídos aleatoriamente, mas são agrupados (PERÉZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).



**Figura 6:** Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. Adaptado de PARKER; RING (2001).

A distribuição do comprimento das cadeias laterais e a estrutura interna da amilopectina podem ter impactos significativos nas propriedades físico-químicas (propriedades térmicas, propriedades de pasta, poder de inchamento e retrogradação) do amido (LI; ZHU, 2017). Portanto, a estimativa da distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina é um dos parâmetros mais importantes para a caracterização da estrutura desta macromolécula e para entendimento da relação entre estrutura química e as propriedades funcionais do amido (PERONI; ROCHA; FRANCO, 2006).

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina pode ser determinada por técnicas tais como cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (HPSEC), cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) e cromatografia permeação em gel (GPC). Entretanto, o GPC permite a separação de cadeias polissacarídicas com diferentes graus de polimerização, mas não é capaz de separar moléculas individuais para efeitos de caracterização (HOYOS-LEYVA; BELLO-PEREZ; ALVAREZ-RAMIREZ, 2017). A HPAEC-PAD provou ser útil para a determinação da distribuição do comprimento da cadeia analisando o grau de polimerização de cadeias individuais. Para isso, enzimas desramificantes, como isoamilase e pululanase, que

hidrolisam especificamente as ligações  $\alpha$  (1-6), são usadas no preparo das amostras, para liberar as cadeias lineares curtas (BULÉON et al., 1998).

Amilopectinas com alta quantidade de cadeias ramificadas de GP 6-12 mostraram difração de raios-X do tipo A, enquanto que aquelas que apresentaram baixa quantidade dessas frações apresentaram padrão tipo B. Amidos com padrão tipo B possuem maiores proporções de cadeias longas ( $GP \geq 37$ ) que os padrões Tipo A. O padrão cristalino tipo C é uma mistura dos A e B. Apesar de algumas tendências das distribuições de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina serem observadas para amidos com mesmo padrão cristalino, cada amido tem seu próprio perfil de distribuição (FRANCO et al., 2001).

Os maiores pesos moleculares são encontrados na molécula de amilopectina ( $10^7$ - $10^9$ ), sendo que a maioria fica na faixa de  $10^8$ . No entanto, existe uma falta de conhecimento sobre a distribuição do peso molecular, pois todas as fases cromatográficas comerciais não são capazes de fracionar este polímero com base no peso molecular (BULÉON et al., 1998).

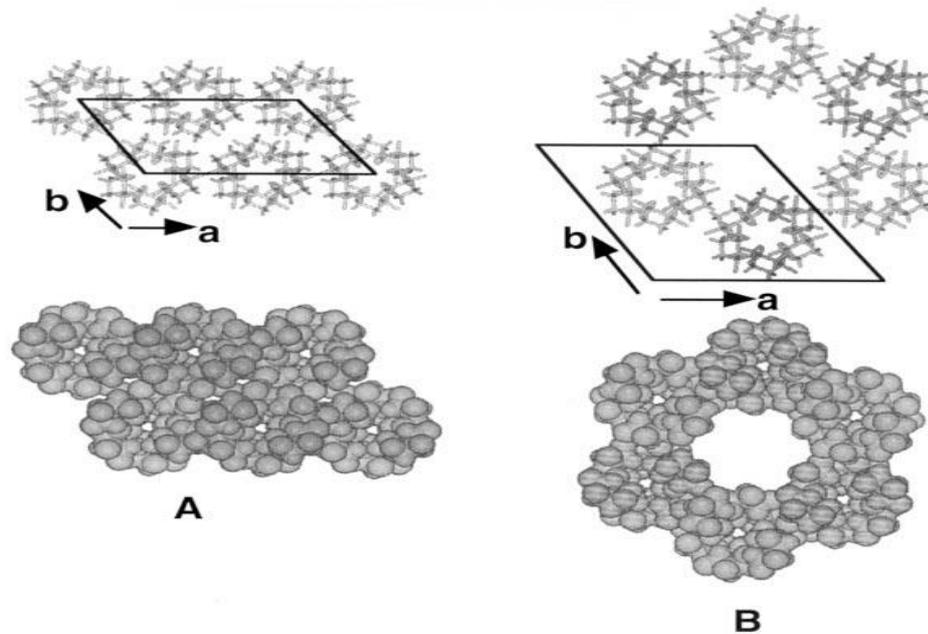
A maioria dos amidos contém 60-90% de amilopectina, embora sejam bem conhecidos os amidos com elevado teor de amilose, com apenas 30% de amilopectina e os amidos cerosos com essencialmente 100% de amilopectina (COPELAND et al., 2009).

### 3.2.3 Estrutura Cristalina

O grânulo de amido tem uma natureza cristalina definida que tem sido atribuída à estrutura bem ordenada das moléculas de amilopectina no interior dos grânulos, ou seja, as ligações ramificadas da amilopectina formam duplas hélices fortemente empacotadas que são arranjadas em domínios cristalinos, enquanto os pontos de ramificação e a amilose ficam nas áreas amorfas (BULÉON et al., 1998; MOORTHY, 2002). Portanto, a cristalinidade dos grânulos de amido é medida por difração de raios-X emitidos pela presença das duplas hélices alinhadas e compactadas formadas pelas cadeias ramificadas da amilopectina (HOOVER, 2001).

Essa cristalinidade proporciona padrões específicos de difração de raios-X, sendo os grânulos de amido classificados em padrões do tipo A e B, dependendo da origem botânica e em função do empacotamento das duplas hélices da amilopectina (Figura 7). Os polimorfismos A e B diferem entre si pelo modo de empacotamento das duplas hélices e teor de água no interior da estrutura (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003; JANE, 2006). A cristalinidade tipo A considerada uma unidade monocíclica altamente condensada e cristalina, onde 12 resíduos de

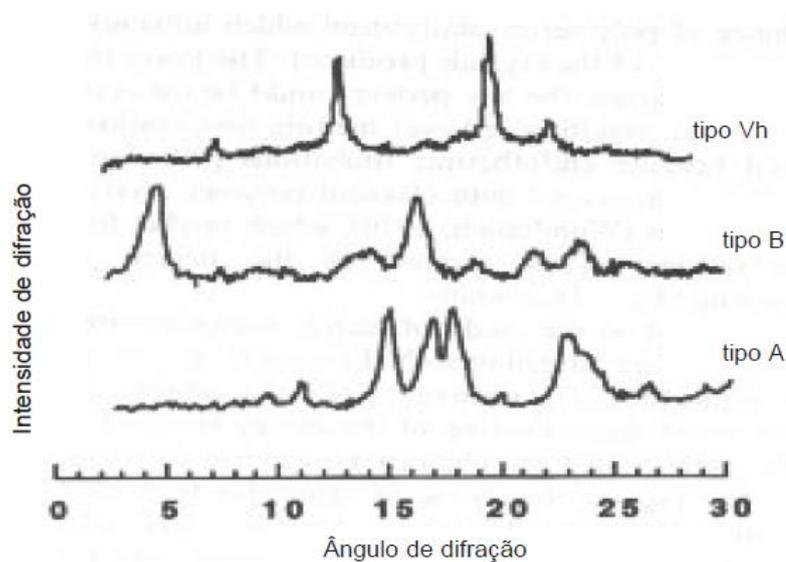
glicose de duas cadeias no sentido anti-horário abrigam 8 moléculas de água entre as hélices, enquanto o tipo B apresenta uma estrutura hexagonal, onde a unidade celular tem duas hélices no sentido anti-horário com 36 moléculas de água ocupando um canal central (BULÉON et al. 1998; DENARDIN; SILVA, 2009).



**Figura 7:** Configuração da estrutura cristalina tipo A e B (BULÉON et al., 1998).

A maioria dos amidos de raízes e tuberosas exhibe padrão de difração de raios-X do tipo B com picos que apresentam duas reflexões principais centradas em  $5,5^\circ$  e  $17,2^\circ$  em  $2\theta$  (HOOVER, 2001). O padrão do tipo A, apresentado principalmente em amidos de cereais como milho e trigo, possui 2 picos entre  $16$  e  $18^\circ$  e um nas proximidades de  $23^\circ$  em  $2\theta$  (GALLANT et al., 1982). O padrão tipo C observado em amidos como os de ervilha e feijão é tido como uma mistura dos padrões A e B (BULEÓN et al., 1998). A classificação em  $C_A$ ,  $C_B$  e  $C_C$  é baseada na extensão de semelhança com os tipos A ou B ou entre os dois tipos, respectivamente (HOOVER, 2001). Há também a cristalinidade do tipo V, que pode aparecer quando a amilose estiver complexada com ácidos graxos e monoglicerídeos, a qual aparece após a gelatinização do amido, e é raramente detectada em amidos nativos (BULÉON et al., 1998) (Figura 8).

Os valores de cristalinidade em amidos nativos variam de 15 a 45%, dependendo não só da origem e a hidratação do amido, mas também da técnica usada (ZOBEL, 1988; BULÉON et al., 1998; ASCHERI et al., 2014).



**Figura 8:** Difractogramas de Rx mostrando os tipos A, B e Vh. Adaptado por Franco et al. (2001).

Zhu (2015) descreve que a diferença muito elevada nos valores de cristalinidade em amidos nativos de mandioca obtidos em outros trabalhos com percentual de cristalinidade na faixa de 15-18% e de 25-50% é provavelmente devida à diferença na metodologia usada e do cálculo analítico, além das diferenças no teor de umidade das amostras analisadas.

A cristalinidade exerce importante função na estrutura do grânulo e em suas características físico-químicas, como a susceptibilidade a enzimas e a insolubilidade em água fria (SANTOS, 2009).

### 3.2.4 Morfologia dos grânulos

A complexidade da biossíntese de amido produz variabilidade no teor das moléculas amilose e amilopectina, o que se reflete na diversidade da morfologia dos grânulos (ASSAD-BUSTILLOS et al., 2014). De acordo com Singh et al. (2003), as características morfológicas de amidos provenientes de fontes diferentes de plantas pode variar com o genótipo e práticas culturais.

Os grânulos de amido variam em tamanho (1 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e forma (poligonal, esférica, lenticular) que podem variar muito em relação ao conteúdo, estrutura e organização das

moléculas de amilose e amilopectina, arquitetura de ramificação da amilopectina e grau de cristalinidade, e distribuição de tamanho da partícula (unimodal, bimodal, trimodal) dos grânulos, as quais são características da origem botânica. Assim, essas variações na forma e tamanho dos grânulos estão associadas com diferenças nas propriedades funcionais, como gelatinização, retrogradação, capacidade de inchamento e solubilidade, comportamento reológico e propriedades de pasta (SINGH et al., 2003; COPELAND et al., 2009; ASSAD-BUSTILLOS et al., 2014).

O tamanho e a forma de grânulos de amido estão entre os fatores de importância na determinação de usos potenciais de amidos. Por exemplo, grânulos pequenos (2,0  $\mu\text{m}$ ) podem ser usados como substitutos de gordura devido ao tamanho ser semelhante ao dos lipídeos, enquanto os grânulos grandes podem ser usados na produção de filmes plásticos biodegradáveis (YONEMOTO; CALORI-DOMINGUE; FRANCO, 2007; LEONEL, 2007).

### **3.2.5 Constituintes menores**

Os grânulos de amido apresentam outros constituintes minoritários, além da amilose e da amilopectina, denominados de constituintes menores e são, principalmente, os lipídeos, o fósforo, as proteínas e as cinzas, pertencentes a compostos de fragmentos da parede celular, compostos superficiais removíveis por procedimentos de extração e componentes internos (HOOVER, 2001).

Os lipídeos representam a fração mais importante associada aos grânulos de amido de cereais, geralmente, apresentam altos teores de lipídeos (0,8 a 1,2 % para amido de trigo e 0,6 a 0,8 % para milho normal) sendo responsáveis pela fixação da cor, desenvolvimento de aromas e complexações que não ocorrem nos amidos de tuberosas que apresentam um teor de lipídeos menor que 1% (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS, 2004; PERONI; ROCHA; FRANCO, 2006).

Há quantidades relativamente pequenas de sais minerais (cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio) nos amidos, os quais são, com exceção do fósforo, de pouca significância funcional. O fósforo pode ser encontrado em três formas principais: monoésteres de fosfatos, fosfolipídeos e fosfatos inorgânicos (TESTER; KARKALAS, 2004).

O fósforo nos amidos de raízes e tubérculos é encontrado na forma de monoéster de fosfato, ligados a regiões específicas dentro da molécula de amilopectina (BLENNOW et al.,

2000; HOOVER, 2001; TESTER; KARKALAS, 2004) aumentando sua capacidade de ligação com a água, poder de inchamento, viscosidade e estabilidade congelamento/descongelamento sendo uma vantagem para muitas aplicações industriais (TESTER; MORRISON, 1990; BLENNOW et al., 2000; FRANCO et al., 2001; HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003).

O teor de proteína nos grânulos pode influenciar as propriedades de intumescimento bem como interferir nas propriedades de pasta e térmicas (ZHU, 2015).

### **3.2.6 Propriedades funcionais do amido**

As propriedades físico-químicas e características funcionais, que são transmitidos pelos amidos aos sistemas aquosos e a sua singularidade em várias aplicações alimentares, variam com a origem biológica (SINGH et al., 2003). Essas propriedades funcionais (solubilidade, poder de inchamento, gelatinização, taxa de retrogradação e estabilidade congelamento-descongelamento entre outras) são largamente determinadas pela estrutura molecular do amido (HOYOS-LEYVA; BELLO-PEREZ; ALVAREZ-RAMIREZ, 2017).

As características do amido tais como massa molecular da amilose e amilopectina, distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina, conteúdo de monoéster de fosfato, fosfolipídeos e lipídeos, tamanho e distribuição do grânulo de amido, as estruturas cristalinas, e arquitetura granular afetam as propriedades funcionais do amido (JANE et al., 1999; TESTER; MORRISON, 1990; FRANCO et al., 2002).

#### **3.2.6.1 Gelatinização e retrogradação**

A compreensão dos passos que ocorrem durante a gelatinização e retrogradação de um amido é fundamental para melhor prever as propriedades funcionais do amido processado, a partir do conhecimento da estrutura de grânulos nativos (COPELAND et al., 2009).

A gelatinização do amido envolve a fusão dos grânulos em meio aquoso sob aquecimento, ocorrendo inicialmente nas regiões amorfas, o que aumenta a mobilidade molecular destas áreas e provoca inchamento reversível. Em seguida, com um aumento da temperatura, todas as duplas hélices da região cristalina são rompidas e os grânulos de amido começam a absorver água intumescendo irreversivelmente, adquirindo tamanho maior que o original (PARKER; RING, 2001; CAMPANHA; FRANCO, 2011). À medida que os grânulos de

amido incham, preferencialmente as moléculas de amilose, por serem mais solúveis e lineares, tendem a sair do grânulo resultando em aumento da viscosidade (PARKER; RING, 2001). As temperaturas de gelatinização variam entre os amidos provenientes de fontes diferentes (SINGH et al., 2003).

Após a gelatinização, ocorre a retrogradação que consiste em transformações que ocorrem durante o resfriamento e armazenamento das pastas de amido gelatinizado. É o processo que ocorre quando as moléculas de amido gelatinizadas começam a reassociar favorecendo uma estrutura mais ordenada (ATWELL, 1988).

As características de retrogradação da amilose e amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose retrograda mais rapidamente, tendo forte tendência a associar-se por meio da formação de interações de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes, formando estruturas cristalinas de duplas hélices quando a solução esfria e se mantém por longo período de tempo. Por outro lado, a amilopectina retrograda em uma taxa muito menor durante um longo período de tempo, dependendo da capacidade das cadeias ramificadas para formar associações (DENARDIN; SILVA, 2009; COPELAND et al., 2009). As cadeias ramificadas longas de amilopectina reassociam-se mais prontamente para formar hélices duplas, enquanto que cadeias ramificadas curtas (DP6-12) retardaram a retrogradação (AI et al., 2011).

As propriedades de retrogradação dos amidos também são indiretamente influenciadas pela disposição estrutural das cadeias de amido nas regiões amorfa e cristalina do grânulo não gelatinizado, porque esta disposição estrutural influencia a extensão da degradação dos grânulos durante a gelatinização e também influencia as interações que ocorrem entre as cadeias do gel de amido durante de armazenamento (SINGH et al., 2006).

A forte interação das cadeias da amilose e amilopectina entre si promove a saída de água do sistema, sendo essa expulsão chamada de sinérese (DENARDIN, SILVA, 2009). A porcentagem de sinérese dos amidos aumenta progressivamente com o tempo de armazenamento e repetições de ciclos de congelamento-descongelamento, sendo, portanto, atribuída à interação entre a amilose e as cadeias de amilopectina, o que leva ao desenvolvimento de zonas funcionais que forcem a saída da água (PERERA; HOOVER, 1999).

Tanto a gelatinização quanto a retrogradação podem ser medidas usando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), que é um método pelo qual a cristalinidade pode ser calculada a partir da entalpia necessária para fundir os segmentos helicoidais duplos. O DSC determina a temperatura inicial ( $T_0$ ), que reflete o início do processo de gelatinização, a temperatura de pico

( $T_p$ ) e a temperatura de conclusão ( $T_c$ ), e sua entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) (TESTER, 1997; BLENNOW et al., 2000). Os parâmetros de gelatinização no DSC são influenciados pela estrutura molecular da amilopectina, razão entre amilose/amilopectina, razão entre região cristalina/amorfa, ou uma combinação destes (ZHANG et al., 2016).

A variação de entalpia da gelatinização  $\Delta H_{gel}$  dá uma medida total da qualidade e quantidade de cristalinidade e é um indicador da perda da ordem molecular dentro do amido. No caso de amido retrogradado, o valor da entalpia fornece uma medida da quantidade de energia de transformação que ocorre durante a fusão da amilopectina recristalizada bem como médias precisas da temperatura de transição do evento endotérmico (SINGH et al., 2003).

A alteração de entalpia reflete principalmente a perda de ordem molecular (hélices duplas) em vez da fusão de cristais de amido e correlacionam-se positivamente com as cadeias ramificadas longas de amilopectina ( $DP \geq 37$ ). Grânulos de amido com maior conteúdo de longas cadeias laterais de amilopectina são mais resistentes ao inchaço devido a maior resistência ao cisalhamento, conseqüentemente, as temperaturas de gelatinização tendem a ser maiores (ZHANG et al., 2016; ZORTÉA-GUINDOLINA et al., 2017).

As altas temperaturas de transição são resultados de um elevado grau de cristalinidade, o que proporciona estabilidade estrutural e faz com que o grânulo seja mais resistente em relação à gelatinização. Por outro lado, amidos retrogradados mostram menores temperaturas de gelatinização e entalpia do que amidos nativos, pois tem cristalinidade mais fraca (SINGH et al. 2003; FERRINI, 2006).

### **3.2.6.2 Poder de inchaço e Solubilidade**

Quando a temperatura de uma suspensão de amido supera o limite de gelatinização, as ligações de hidrogênio são rompidas as moléculas de água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e da amilopectina, causando aumento dos grânulos devido ao inchaço e parcial solubilização (FRANCO et al., 2001).

O poder de inchaço e solubilidade fornece provas da magnitude da interação entre cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos, varia com a fonte de amido, mas também pode ser devido às diferenças na estrutura morfológica dos grânulos de amido (SINGH et al., 2003). Os amidos com associações intermoleculares mais elevadas e teores mais elevados

de amilose tendem a apresentar menor poder de inchamento (ZORTÉA-GUIDOLINA et al., 2017).

O inchaço dos grânulos de amido é controlado por vários fatores, incluindo a composição do amido, as estruturas de amilopectina e amilose e a presença de componentes secundários tais como monoésteres de fosfato e fosfolipídeos (SRICHUWONG et al., 2005).

O poder de inchamento mede a capacidade de hidratação dos grânulos, sendo a determinação realizada pelo peso do grânulo de amido intumescido (inchado ou expandido) e de sua água oclusa (FRANCO et al., 2001; FALADE; OKAFOR, 2013). A amilopectina é a principal responsável pelo poder de inchamento dos grânulos sendo que a amilose agiria como um solvente (TESTER; MORRISON, 1990; ASCHERI et al., 2014). Por outro lado, a solubilidade mede a capacidade dos sólidos dissolver-se ou dispersar-se numa solução aquosa (principalmente água) (FALADE; OKAFOR, 2013).

A amilose retém o inchaço e mantém a integridade dos grânulos inchados, e as cadeias de amilose complexadas com lipídeos restringem o inchaço granular e a lixiviação de amilose (HUANG et al., 2015).

Acredita-se que a amilose é amorfa e concentrada na maior parte na região amorfa dos grânulos e que as lamelas amorfas dos grânulos são, na sua maioria, constituídas pelas partes internas da amilopectina. A amilose pode emaranhar-se e interagir com as partes internas da amilopectina nas lamelas amorfas dos grânulos, inibindo a lixiviação de amilose (LI; ZHU, 2017).

### 3.3 BIOETANOL

O aumento global do consumo de energia, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, e as mudanças climáticas estão forçando a busca de novas fontes de energia e de formas alternativas de combustíveis, que levam à implementação de políticas destinadas a incentivar a produção e utilização de bioenergia renovável (ALVIRA et al., 2010; PEREZ-REA et al., 2013).

Os biocombustíveis podem ser considerados como uma alternativa viável para a diversificação energética no transporte rodoviário, especialmente o bioetanol de primeira geração e o biodiesel, que representam a maior parte da produção total nos Estados Unidos, Brasil e União Europeia (MORALES; LÓPEZ, 2017).

O bioetanol é mais comumente misturado com gasolina em concentrações de 10% de bioetanol para 90% de gasolina, conhecido como E10 e apelidado de "gasohol". O bioetanol pode ser utilizado como uma mistura a 5% com gasolina de acordo com a norma de qualidade da União Europeia (UE) EN 228. Esta mistura não requer nenhuma modificação do motor e está coberta por garantias de veículo, entretanto com a modificação do motor, bioetanol pode ser usado em níveis mais elevados como o E85 (85 % de bioetanol) (BALAT, 2011).

As fontes renováveis usadas para gerar bioetanol podem ser classificadas em grande parte em açúcares, amido, biomassa lignocelulósica e algas. O bioetanol obtido a partir de açúcares e amido é referido como o bioetanol de primeira geração, enquanto que a biomassa lignocelulósica e as algas produzem bioetanol de segunda e terceira geração, respectivamente (ZABED et al., 2017). A produção do bioetanol a partir do amido ou açúcares depende da disponibilidade de matéria-prima, a variabilidade e sustentabilidade (THATOI et al., 2014).

Para a produção de bioetanol de primeira geração no mundo, culturas como a cana-de-açúcar, milho e trigo têm sido usadas como principais matérias-primas. Os Estados Unidos são o produtor dominante de bioetanol de milho, produzindo 54 bilhões de litros em 2014 e, ao mesmo tempo, exportou cerca de 825 milhões de galões de bioetanol para 51 países em todo o mundo (IZMIRLIOGLU; DEMIRCI, 2016; ZABED et al., 2017).

A produção brasileira de bioetanol em 2015 atingiu cerca de 30 bilhões de litros de etanol, divididos em 19 bilhões de bioetanol hidratado e 11,3 de bioetanol anidro, assim, o volume de bioetanol total produzido foi 6% superior a 2014. Conforme o estudo, os principais fatores que levaram a esse recorde foram a boa safra de cana-de-açúcar e as medidas governamentais que aumentaram a atratividade do bioetanol, como a elevação do percentual de anidro na gasolina C, que passou de 25 % para 27 %; o retorno da Contribuição de Intervenção de Domínio Econômico (Cide) e a elevação do PIS/Cofins para a gasolina A (EPE, 2016). Os maiores produtores e consumidores do bioetanol são os Estados Unidos e Brasil, que juntos, são responsáveis por quase 90 % da produção mundial, seguido pela China (8,9 %), pela União Europeia (5,3 %) e pela Índia (4 %) (JAGATEE et al., 2015).

A produção de bioetanol no Brasil, em sua grande maioria, origina-se do cultivo da cana-de-açúcar, podendo ser citado ainda a mandioca como outra opção de matéria-prima alcooleira. Dados mostram que a produção estimada de etanol a partir de mandioca pode atingir cerca de 6197,40 L/ha, comparando com a cana-de-açúcar (7199,50 L/ha) e o milho (1980 L/ha) (VALE; FELTRAN; CARVALHO, 2009).

As culturas de amido são amplamente utilizadas para a produção de bioetanol devido à sua disponibilidade em todo o mundo, facilidade de conversão, capacidade de armazenamento por um longo período e alto rendimento de etanol, mas há necessidade de hidrólise para posterior fermentação (ALVIRA et al., 2010; PEREZ-REA et al., 2013; ZABED et al., 2017).

A produção de bioetanol geralmente utiliza derivados de culturas alimentares e oferta limitada dessas culturas pode levar à competição entre sua utilização na produção de bioetanol e a provisão de alimentos. O uso de culturas alimentares para produzir bioetanol levanta grandes preocupações nutricionais e éticas (BALAT, 2011). Em geral, cerca de 45% das culturas de raízes e tubérculos produzidas são consumidas como alimento, sendo o restante utilizado na alimentação animal ou para processamento industrial de produtos como o bioetanol. Nos países desenvolvidos, o consumo de alimentos de raízes e tubérculos é consideravelmente menor do que nos países em desenvolvimento. Assim, os tubérculos excedentes que não sejam utilizados para a alimentação poderiam ser utilizados para a produção de combustíveis sem afetar o fornecimento de alimentos para os seres humanos (ALVIRA et al., 2010; THATOI et al., 2014).

A busca por novas matérias-primas para produção de bioetanol, assim como a inovação na tecnologia industrial utilizada para fontes amiláceas, já faz parte da agenda dos países detentores de alta tecnologia, como Alemanha, Dinamarca, Bélgica, Suécia, Estados Unidos e França. No caso dos Estados Unidos, mesmo com uma agricultura subsidiada, foi deixado de lado os questionamentos acerca da eficiência da produção de bioetanol a partir do milho, optando-se por investimentos maciços em toda a cadeia, tanto no campo da ciência e tecnologia como no incentivo à produção propriamente dita (JAGATEE et al., 2015).

Os tubérculos de taioba estão entre as espécies comestíveis cultivadas comercialmente com potencial para servir como bons substratos para fermentação, com produtividade de 50 t/ha, rendimento prático de amido na extração de 24,69 % e rendimento potencial de amido de 12,35 t/ha (GARCIA; LEONEL, 2005).

### 3.4 HIDRÓLISE DO AMIDO

O amido é uma matéria-prima de alto rendimento para a produção de etanol, mas não é diretamente fermentável, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas (ZANIN, 2000).

Uma das características mais importantes da catálise enzimática é sua especificidade, sendo muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012). Uma vez que as enzimas são altamente específicas nas reações que catalizam, evita-se a formação de subprodutos como evidenciado na hidrólise ácida diluída e os custos de tratamento de resíduos são reduzidos. Além disso, as reações enzimáticas ocorrem em condições suaves e podem atingir rendimentos elevados com quantidades relativamente baixas de catalisadores (MOSHI et al., 2015).

Entre as enzimas necessárias para a hidrólise do amido, o grupo principal compreende enzimas amilolíticas que atuam sinergicamente para romper os polissacarídeos do amido (amilose de cadeia linear e amilopectina de cadeia ramificada) em glicose (CINELLI et al., 2014).

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial e são amplamente distribuídas na natureza sendo sintetizadas em vários tecidos de animais, plantas superiores, bem como por fungos, leveduras e bactérias. Um grande número de amilases microbianas está disponível comercialmente e têm substituído quase completamente a hidrólise química na indústria de processamento do amido. No entanto, aquelas produzidas por microrganismos termofílicos e termotolerantes são especialmente interessantes por serem normalmente termoestáveis e poderem ser usadas nos processos de sacarificação que ocorrem em altas temperaturas (CERQUEIRA, 2012; SAHNI; GOEL, 2015).

Com base no local de ação, as amilases podem ser divididas em duas categorias: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso, no interior da molécula de amido liberando oligossacarídeos, enquanto as exoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula liberando glicose ou maltose (REDDY; NIMMAGADDA; RAO, 2003). As enzimas amilolíticas utilizadas na produção de glicose industrial são  $\alpha$ -amilase, isoamilase, pululanase,  $\beta$ -amilase e amiloglucosidase.

As pululanases (EC 3.2.1.41  $\alpha$ -dextrina-6-glucohidrolase) são endoamilases desramificantes que clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 do pululano (polissacarídeo linear), produzindo maltotriose. Essa enzima quando combinada com  $\alpha$ -glucosidases na sacarificação de amido (Figura 9), melhora a taxa e rendimento da sacarificação (LÉVÊQUE et al., 2000).

As  $\beta$ -amilases (E.C. 3.2.1.2 1,4- $\alpha$ -D-gluco maltohidrolase) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação  $\alpha$  -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de

amilose e amilopectina, formando sempre resíduos de maltose, não é capaz de romper ligações  $\alpha$ -1,6 (FRANCO et al., 2001). São encontradas em diversas plantas e raramente em microrganismos (AIYER, 2005).

As isoamilases (E.C. 3.2.1.68 glicogênio-6-glucanohidrolase) são endoenzimas desramificantes que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 de amilopectina, glicogênio, várias dextrinas ramificadas e oligossacarídeos, mas não hidrolisa a ligação  $\alpha$ -1,6 do pululano. Algumas isoamilases são obtidas de microrganismos e são usadas para desramificar a molécula de amido na produção de glicose e maltose (AIYER, 2005).

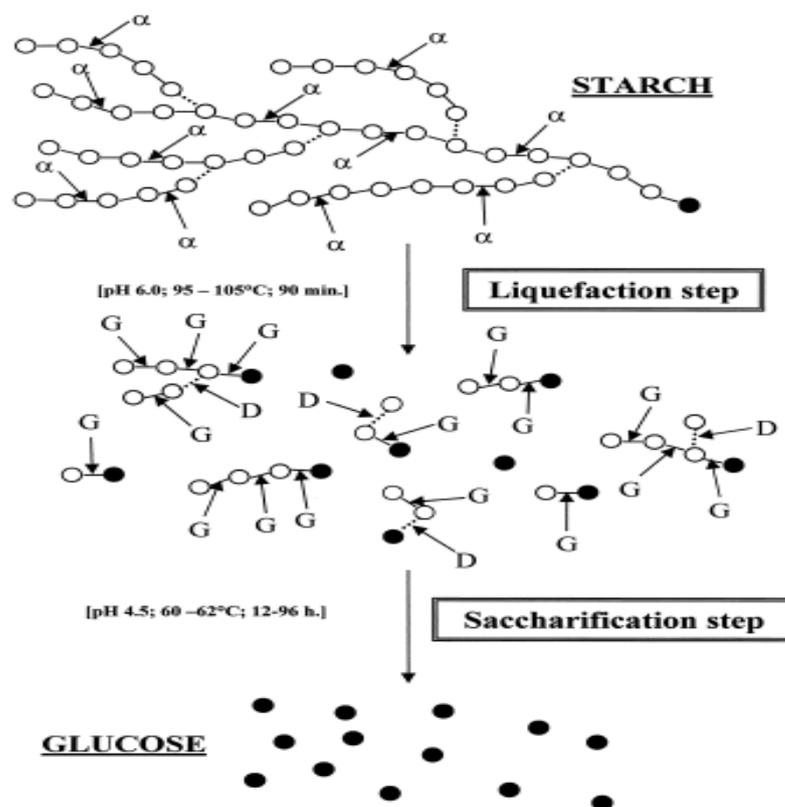
As  $\alpha$ -amilases (E.C 3.2.1.1  $\alpha$ -D glicano glicanohidrolase) são endoenzima que atuam nas ligações  $\alpha$  -1,4 ao acaso, das cadeias de amilose e amilopectina, deixando ligações  $\alpha$  -1,6 intactas, iniciando o ataque pelas extremidades não redutora (Figura 9), originando maltose e dextrina-limite (3 a 4 resíduos de glicose) e poucas moléculas de glicose, com dextrose equivalente (DE) inferior a 30. Algumas  $\alpha$ -amilases apresentam atividade de hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6, mas com eficiência reduzida (FRANCO et al., 2001; RUIZ et al., 2011; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012). Produzida na saliva e no pâncreas, a amilase também é produzida por diversos fungos, bactérias e vegetais (SANKALIA; MASHRU; SANKALIA, 2007). A ação desta enzima no amido conduz a uma diminuição rápida da viscosidade da solução de amido, sendo que as  $\alpha$ -amilases de liquefação hidrolisam 30% a 40% o amido e as  $\alpha$ -amilases de sacarificação hidrolizam 50% a 60% (LÉVÊQUE et al., 2000).

As amiloglucosidases ou glucosidases (E.C 3.2.1.31,4- $\alpha$ -D glucano glucanohidrolase) são exoenzimas sacarificantes utilizadas para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 para se obter produtos tais como a maltose ou xaropes de D-glucose. A ação da amiloglucosidase 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 (Figura 9) (RUIZ et al., 2011; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

As  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase são produzidas comercialmente em grandes quantidades a partir de microrganismos (*Bacillus* e *Aspergillus* sp.) e representam cerca de 25-33% do mercado mundial de enzima, perdendo apenas para as proteases (NGUYEN et al., 2002). A amiloglucosidase é produzida principalmente por fungos e leveduras, sendo termolábeis e permanece ativa em pHs ácidos (BAGHERI; KHODARAHMI; MOSTAFAIE, 2014).

A estratégia para o uso de enzimas na produção de bioetanol a partir de amido inclui duas etapas: liquefação e sacarificação (ARAPOGLOU et al., 2010).

A liquefação é um processo de dispersão dos grânulos de amido insolúveis em solução aquosa, seguido por hidrólise parcial usando amilases termoestáveis (AIYER, 2005). Na liquefação, a  $\alpha$ -amilase, obtida a partir de bactérias termorresistentes, tais como *Bacillus licheniformis* ou de estirpes de *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*, são utilizadas para hidrolisar o amido produzindo dextrinas e polímeros menores, diminuindo a viscosidade do meio (ARAPOGLOU et al., 2010). As enzimas termoestáveis bacterianas de *Bacillus licheniformis* ou *B. amyloliquefaciens* possibilitam a liquefação a temperaturas elevadas (80-110 °C) (RUIZ et al., 2011).



**Figura 9:** Hidrólise enzimática industrial de amido em glicose e padrão de ação de enzimas amilolíticas.  $\alpha$  :  $\alpha$ -amilase; G: glucosidase; D: enzima desramificante (pululanase); O: resíduo  $\alpha$ -D-glucose não redutor (LÉVÊQUE et al., 2000).

A liquefação de amido envolve geralmente a gelatinização do amido antes ou durante a adição da  $\alpha$ -amilase porque o amido granular (não gelatinizado) é hidrolisado muito lentamente

quando comparado ao amido gelatinizado cuja cristalinidade foi largamente destruída. Assim, o grau de liquefação do amido está intimamente relacionado com a gelatinização (LI et al., 2015).

A temperatura de gelatinização varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para assegurar a gelatinização completa do amido e a eficiência no processo de fermentação para produção de etanol (AJIBOLA; EDEMA; OYEWOLE, 2012; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

Foi relatado que a gelatinização do amido consome até 30% da energia total necessária para a produção de etanol (SRICHUWONG et al., 2012). Entretanto, há poucas amilases relatadas na literatura que possuem a capacidade de hidrolisar eficazmente altas concentrações de suspensões de amido granular sem aquecimento, devido ao efeito inibitório dos substratos ou produtos sobre a atividade da enzima (SLAVIC et al., 2015).

Há outros fatores que afetam a liquefação do amido tais como a concentração do amido; a fonte e atividade da  $\alpha$ -amilase; a concentração de íons de cálcio que estão relacionados com a ativação e estabilidade da  $\alpha$ -amilase; e outras condições de reação, tais como temperatura e pH (LI et al., 2015). A agitação também favorece a interação entre enzima-substrato facilitando a mobilidade da enzima  $\alpha$ -amilase durante a liquefação, com redução da viscosidade da pasta de amido (MONTESINO; NAVARRO, 2000).

Na primeira etapa de hidrólise do amido, a liquefação é considerada o primeiro e mais importante passo no processamento, cujo objetivo é proporcionar uma suspensão de amido parcialmente hidrolisada de viscosidade relativamente baixa, estável à retrogradação e adequada para a segunda etapa que é a sacarificação (AIYER, 2005). Na liquefação, os produtos da hidrólise são dextrina, maltose, maltotriose e maltopentoses com um equivalente de dextrose (DE) inferior a 30 (RUIZ et al., 2011).

A etapa de sacarificação pode ser usada uma endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima (amiloglucosidase). O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose. A natureza, a dosagem, a temperatura, o pH e o tempo de ação da enzima influenciam na composição final da solução após a sacarificação (AJIBOLA; EDEMA; OYEWOLE, 2012; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

A sacarificação é realizada em temperaturas mais baixas (60-70 °C) por meio de amiloglucosidases obtidas geralmente a partir de espécies de *Aspergillus niger* ou *Rhizopus* sp. e que hidrolisam as ligações químicas  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-6) para se obter produtos tais como a maltose

ou xaropes de D-glucose com dextrose equivalente (DE) na faixa de 40 a 96 (RUIZ et al., 2011; AJIBOLA et al., 2012).

Os produtos resultantes da hidrólise são, geralmente, expressos em dextrose equivalente, que corresponde aos açúcares redutores calculados como uma porcentagem da substância seca (AIYER, 2005).

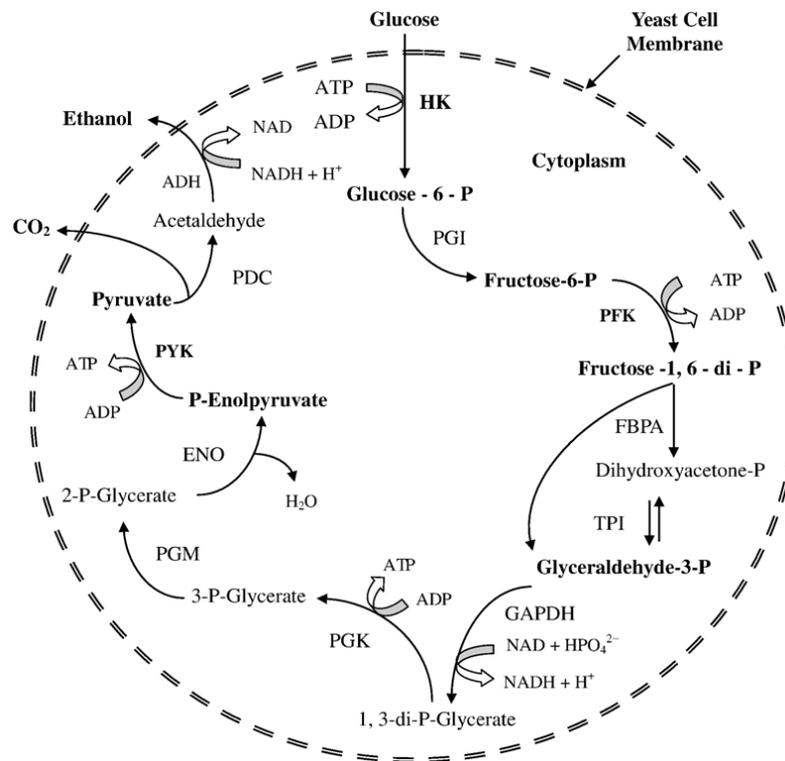
### 3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo metabólico de microrganismos (leveduras ou bactérias) para obtenção de energia na qual são capazes de converter açúcares assimiláveis (glicose ou frutose) em bioetanol e CO<sub>2</sub>, através de uma série de reações bioquímicas, reguladas enzimaticamente. A fermentação é o terceiro passo que conduz à produção de bioetanol a partir de biomassa sacarificada (JAGATEE et al., 2015).

Tradicionalmente, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* são utilizados para fermentação, sendo que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microorganismo de escolha para a produção industrial de bioetanol, devido à sua capacidade fermentativa superior e à tolerância aos agentes envolvidos em bioprocessos em larga escala, ou seja, elevada tolerância ao etanol e outros inibidores (formadas em substratos pré-tratadas ou produzidos durante a fermentação) e a capacidade para crescer rapidamente sob condições anaeróbias (ZANIN, 2000; BALAT, 2011; REIS et al., 2012; JAGATEE et al., 2015).

Entre os açúcares fermentescíveis pelas leveduras estão os monossacarídeos como glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos como maltose e sacarose e os trissacarídeos como rafinose e maltotriose (dependendo da cepa). Entretanto, os polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados por leveduras (ZHANG et al., 2011).

A principal via metabólica envolvida na fermentação do etanol é a glicólise, através da qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas, como ilustrado na Figura 10. Sob condições anaeróbicas, o piruvato é ainda reduzido a etanol com a liberação de CO<sub>2</sub> e teoricamente, o rendimento é de 0,511 para o etanol e de 0,489 para o CO<sub>2</sub> numa base de massa de glicose metabolizada. Duas ATPs produzidas na glicólise são utilizadas para conduzir a biossíntese de células de levedura que envolve uma variedade de bio-reações que requerem energia (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).



**Figura 10:** Via metabólica da fermentação do etanol em *S. cerevisiae*. Abreviaturas: HK: hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfogliceromutase ENO: enolase PYK: Piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Com amido de babaçu, as cepas comerciais de levedura alcooleira são capazes de crescer entre 30-35 °C e faixa de pH de aproximadamente 3,5 a 6,0, sendo que temperatura acima de 30 °C diminuem rapidamente a atividade metabólica (CINELLI et al., 2014). Resultado confirmado por Baruque Filho; Baruque e Sant`Anna (2000), verificaram que a melhor condição de fermentação com *S. cerevisiae* a 30°C e pH 6,0 em tanques abertos com agitação, alcançando um rendimento de 0,6 L etanol/kg amido, o que corresponde a aproximadamente 290 litros de etanol por tonelada de farinha de babaçu.

Várias estirpes de leveduras a partir de diferentes fontes têm sido usadas em trabalhos na produção de etanol (HASHEM; DARWISH, 2010; ZHANG et al., 2011; ROMANI et al., 2015). As espécies de *Saccharomyces* são geralmente tolerantes ao álcool e podem crescer na presença

de 8 - 12% v/v de álcool, sobrevivendo na presença de até 15% de álcool (AJIBOLA; EDEMA; OYEWOLE, 2012).

A fermentação para produção de etanol é influenciada por fatores como substrato, temperatura de fermentação, nitrogênio amino livre, fontes de nitrogênio, contaminação bacteriana assim como a composição e pré-processamento da matéria-prima (WU et al., 2006). A fermentação requer tipicamente 12-72 h de incubação em função da quantidade e tipo de microrganismo (THATOI et al., 2014).

Considerando que o processo fermentativo industrial ocorre em condições não-estéreis, a contaminação com leveduras endógenas é praticamente inevitável, e apenas as cepas mais adaptadas fisiologicamente tendem a dominar (OLIVEIRA et al., 2014).

O aumento no tamanho do inóculo causará um aumento na produção de bioetanol, até certo ponto, devido à melhor utilização dos açúcares, o que resulta na produção extracelular de bioetanol. Contudo, após atingir o nível ótimo de inóculo, a alta concentração de inóculo pode afetar adversamente a produção de bioetanol, reduzindo a viabilidade da população de leveduras (TAN; LEE, 2014).

A quantidade e tipos de fonte de nitrogênio não só afetam o crescimento das células de levedura, mas também influenciam as quantidades de subprodutos e rendimento de bioetanol. A levedura geralmente produz mais bioetanol e menos glicerol e outros subprodutos quando os aminoácidos são usados como fonte suplementar de nitrogênio (WU et al., 2006).

O glicerol é produzido a um nível de cerca de 1,0% (p/v) para a maioria das fermentações com bioetanol. Outros subprodutos tais como ácidos orgânicos e alcoóis superiores são produzidos em níveis muito mais baixos. A produção destes subprodutos, assim como o crescimento de células de levedura, diminui o rendimento de bioetanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Embora a *S. cerevisiae* JP1 mostre uma excelente taxa de conversão de açúcar em etanol (93%), a produtividade e os rendimentos são inferiores aos observados em outras estirpes industriais devido à sua robusta produção de glicerol, que protege a célula contra o estresse osmótico (REIS et al., 2012).

O nitrogênio assimilável é um componente importante dos meios de fermentação e desempenha um papel significativo no decurso da fermentação. O nitrogênio é necessário para o crescimento e multiplicação, influencia a tolerância ao etanol das leveduras e a taxa de produção de etanol. A adição de nitrogênio amino livre (FAN) leva a maiores concentrações finais de

etanol nos meios fermentados e quantidades de acumulação de massa celular (BAFRNCOVA et al., 1999).

A fermentação pode ser acoplada à sacarificação (sacarificação e fermentação simultâneas, SSF) ou separada da operação unitária (hidrólise e fermentação separadas, SHF) (LIN et al., 2016). Um processo em sacarificação e fermentação simultâneas requer uma condição intermediária de temperatura para as enzimas e para a levedura adicionada, uma vez que a temperatura ótima para a sacarificação é cerca de 55 °C e 30 °C para a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, assim como a agitação também é outra variável que requer uma condição intermediária, já que para a sacarificação é, geralmente, realizada a 120-150 rpm e o microrganismo converte satisfatoriamente glicose em etanol e CO<sub>2</sub> apenas em condições de anaerobiose. A vantagem do processo de hidrólise e fermentação separadas, é que as temperaturas da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas (SANTOS; SOUTO-MAIOR; GOUVEIA, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

As matérias-primas utilizadas na primeira parte deste projeto foram tubérculos de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) colhidos da Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão, localizado na Cidade Universitária Paulo VI no município de São Luís-MA; amido extraído de mandioca (*Manihot esculenta*) da cultivar Cascudinha foi obtido do laboratório de Cereais Raízes e Tubérculos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto-SP.

As enzimas comerciais utilizadas foram  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* (Liquozyme Supra 2.2X), e a enzima amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (AMG 300L) da Novozymes.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1 foram isoladas da destilaria Japungu Agroindustrial (Santa Rita-PB, Brasil), e obtida do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto-SP. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

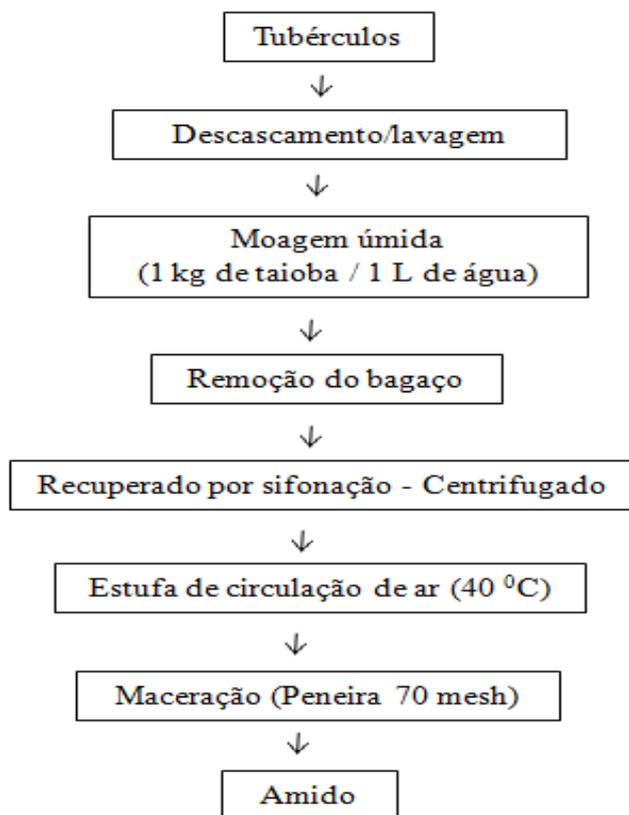
## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Isolamento do amido de taioba

O amido foi isolado dos tubérculos de taioba seguindo o procedimento descrito por Peroni, Rocha e Franco (2006), com modificações (Figura 11). Na colheita foram separadas as folhas dos tubérculos, e estes foram lavados para retirada das impurezas. Em seguida, foram descascados e cortados em cubos pequenos, e moídos com água, na proporção de 1 quilo de taioba para 1 litro de água, num liquidificador industrial de aço inox, por 40 s. Utilizou-se uma solução de metabissulfito de sódio (Synth) (5 g/L de água), numa proporção de 1 kg de matéria-prima/2L de solução de metabissulfito para prevenir o escurecimento do amido.

A suspensão obtida pela moagem foi passada através de peneiras de abertura de 80 mesh (0,177 mm) e 150 mesh (0,105 mm) para remoção do bagaço. O bagaço retido na peneira de 80 mesh foi misturado com água, na proporção de 1:1 (v:v), e moído por 20 s para retirada do amido residual. O amido foi recuperado por sifonação, lavado com água destilada até que o sobrenadante estivesse limpo, recuperado por centrifugação e seco em estufa com circulação de ar a temperatura de 40 °C.

O amido obtido após secagem foi macerado em almofariz, passado por peneira de 70 mesh (0,212 mm) e armazenado em potes tampados a temperatura de refrigeração para posterior utilização.



**Figura 11:** Fluxograma de isolamento do amido de taioba.

## 4.2.2 Caracterização dos amidos

### 4.2.2.1 Composição Química do Amido

Os teores de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas foram determinados de acordo com Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC) (2000). O teor de fósforo foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Smith e Caruso (1964). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### 4.2.2.2 Forma e distribuição de tamanho de grânulos dos amidos

A forma dos grânulos de amido nativo foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Philips XL – 30 FEG, Eindhoven, Netherlands). As amostras foram dispersas em etanol anidro e aplicadas em uma superfície de fita adesiva. As amostras foram cobertas com

uma camada de 14 nm de ouro usando o equipamento Balzers Sputter Coater (modelo SC 50, SCD 004, Eindhoven, Netherlands). A potência do feixe utilizada foi de 5 kV. As ampliações utilizadas foram de 500 x, 1.000 x e 5000 x com escalas de 50, 20 e 5  $\mu\text{m}$ .

A distribuição de tamanho dos grânulos foi realizada em microscopia ótica através do Sistema de Análise de Imagem Axio Vision Rel. 4.8.2 – SP2 da ZEISS. As amostras foram coletadas com fio de platina e misturadas sobre lâminas de vidro em solução de glicerina (50% v/v), sendo cobertas por lamínula. Preparadas as lâminas, estas foram observadas em microscópio óptico (AXIOSKOP 2 Plus - ZEISS) e as imagens selecionadas foram analisadas pelo sistema. Os grânulos foram distribuídos quanto aos diâmetros: 0-1,99 $\mu\text{m}$ ; 2,0-4,99 $\mu\text{m}$ ; 5,0-9,99 $\mu\text{m}$ ; 10,0-14,99 $\mu\text{m}$ ; 15,0-19,99 $\mu\text{m}$ ; 20,0-24,99 $\mu\text{m}$ ; 25,0-29,99 $\mu\text{m}$ ; 30,0-34,99 $\mu\text{m}$ ; 35,0-39,99 $\mu\text{m}$  e >40,0 $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.3 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os amidos foram inicialmente desengordurados como descrito no método de Jane e Chen (1992). Ao amido desengordurado (15 mg) foram adicionados 1 mg de glicose e 5 mL de eluente (NaCl 25 mM e NaOH 1 mM). A mistura foi mantida sob constante agitação em banho de fervura por 30 min e então resfriada a temperatura ambiente antes de ser aplicada na coluna empacotada com Sepharose CL-2B.

Uma alíquota de 3,0 mL da mistura contendo 9 mg de amido foi aplicada em uma coluna (1,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) empacotada com o gel Sepharose CL-2B, seguindo procedimento de Wang et al. (1993). As amostras foram eluídas de forma ascendente. O eluente consistiu de NaCl (25mM) e NaOH (1mM) com um fluxo de 0,5 mL/min.

Frações de 2,5 mL foram coletadas da coluna Sepharose CL-2B a cada 5 min e submetidas às análises de carboidratos totais e teor de amilose usando o método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al, 1956) e reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971), respectivamente. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.2.2.4 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina

#### 4.2.2.4.1 Desramificação dos amidos

Os amidos foram desramificados utilizando isoamilase (EC 3.2.1.68) obtida de *Pseudomonas* sp. (Megazyme International, Wicklow, Irlanda), seguindo o procedimento de Wong e Jane (1995), com modificações. Uma dispersão de 5 mL de amido em DMSO 90% (10 mg/mL) foi agitada em banho de fervura por 1 hora e depois por mais 16 horas, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol anidro e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 12.000 g por 10 min. O amido recuperado foi suspenso em 1,8 mL de água ultra pura (18 MΩ.cm) e mantido em banho de água fervente por 30 min com agitação.

Após resfriamento, 0,2 mL de tampão acetato 0,1 M pH 3,5, 6 µL de solução de azida 10% (p/v) e 3µL de isoamilase (Megazyme, 3U) foram adicionados e a mistura foi incubada a 40 °C por 16 h sob agitação de 100 rpm. Após este período, o pH foi ajustado para 6,5-7,0 com NaOH 1M e 0,1 M e a suspensão colocada em banho de água fervente por 15min, para inativação da enzima. Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm.

#### 4.2.2.4.2 Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos desramificados com isoamilase foi analisada usando sistema cromatográfico HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Alíquotas de 20 µL das amostras preparadas e filtradas anteriormente foram automaticamente injetadas no equipamento constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-200 (3 X 250 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200 (3 X 50 mm). A forma de onda empregada foi a standard quadruple com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t1 = 0,40 s); E2 = -2,00 V (t2 = 0,02 s); E3 = 0,60 V (t3 = 0,01 s); E4 = -0,10 V (t4 = 0,06 s). A fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (1M acetato de sódio e 100 mM NaOH) com fluxo de 0,5mL/min e temperatura de 30 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N<sub>2</sub>. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min, gradiente linear de 0 a 70 mM de

acetato de sódio; 10 - 80 min, gradiente linear terminando com 350 mM de acetato de sódio; 80 a 110 min a concentração de 350 mM de acetato foi mantida. A concentração de hidróxido de sódio foi mantida constante em 100 mM durante toda a corrida. Uma mistura de maltodextrinas (grau de polimerização 1-7) foi usada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

#### 4.2.2.5 Teor de amilose

##### 4.2.2.5.1 Isolamento da amilopectina

As amilopectinas dos amidos nativos foram isoladas segundo Jane e Chen (1992), com modificações. As amostras de amido (2 g) foram dispersas em 200 mL de solução de dimetil sulfóxido (DMSO) 90 % e mantidas em agitação constante por 1h em banho de água fervente e a temperatura ambiente durante 16 h. O amido foi precipitado com 400 mL de etanol anidro e centrifugado a 12000 g por 15 min. O precipitado foi suspenso em 400 mL de água deionizada e o pH ajustado entre 5,9-6,3 utilizando tampão fosfato (16,4 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 3,6 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). A suspensão foi mantida em banho de água fervente com refluxo durante 1 h seguido da adição de 15-20% de n-butanol e refluxo por mais 30 min. A amostra foi resfriada lentamente (24-36 h) em garrafa térmica pré-aquecida. O complexo amilose-butanol foi separado por centrifugação a 12000 g por 15 min. O sobrenadante foi evaporado até a metade do volume inicial em rotoevaporador e levado novamente ao refluxo. Essa etapa foi repetida até não haver mais a formação de precipitado após a centrifugação. A amilopectina foi precipitada com etanol anidro e recuperada por centrifugação a 12000 g por 10 min. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol anidro, filtrado a vácuo e seco em estufa a 38 °C durante 24 h.

##### 4.2.2.5.2 Determinação dos teores de amilose aparente e absoluto

Os amidos nativos foram previamente desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002). Amostras de 0,5 g de amido foram dispersas em 25 mL de DMSO 90 %, colocadas sob agitação em banho de água fervente por 1 h, e agitadas por mais 16 h à temperatura

ambiente. Os amidos foram precipitados com aproximadamente 75 mL de etanol anidro e centrifugados a 12000 g por 10 min. Em seguida, os amidos precipitados foram novamente dispersos em etanol anidro, filtrados a vácuo, e secos em estufa com circulação forçada de ar a 38 °C.

A afinidade por iodo (AI) dos amidos desengordurados e das amilopectinas purificadas foi determinada usando um autotitulado potenciométrico (716 DMS Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland). Os teores de amilose aparente e absoluto foram determinados usando a metodologia descrita por Schoch (1964) com modificações de Kasemsuwan et al. (1995). Todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em triplicata. O teor de amilose aparente foi calculado segundo a equação 1, e o teor de amilose absoluta usando a equação 2.

$$AMap = 100 \times AIA / 20\% \quad (1)$$

$$AMabs = 100 \times (AIA - AIA_p) / (20\% - AIA) \quad (2)$$

Em que:

AMap = teor de amilose aparente

AMabs = teor de amilose absoluta

AIA = afinidade por iodo do amido

AIA<sub>p</sub> = afinidade por iodo da amilopectina isolada

20% = afinidade por iodo da amilose pura (TAKEDA; HIZUKURI; JULIANO, 1987)

#### 4.2.2.6 Difração de raios-X e cristalinidade relativa

As amostras foram previamente equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl<sub>2</sub> saturada (25 °C, aw = 0,9) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X foram determinados em difratômetro de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação monocromática de Cu, K $\alpha$  ( $\lambda = 0.1542$  nm). As amostras foram analisadas de 3° a 40° em 2 $\theta$  com velocidade de varredura de 1°/min e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente calculada baseando-se na relação entre a área dos picos e área total dos difratogramas, conforme método descrito por Nara e Komiya (1983).

#### 4.2.2.7 Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta dos amidos foram determinadas utilizando um Rápido Visco Analisador (RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Austrália) de acordo com o procedimento descrito por Franco et al. (2002). Suspensões de amido (10 % m/m, num total de 27,5 g) foram colocadas em recipientes de alumínio próprios do equipamento, e estes acoplados ao RVA. No início da análise, as amostras foram mantidas a 30 °C por 1 min; após este tempo, foram aquecidas a 95 °C a uma razão de 6 °C/min e permaneceram nesta temperatura por 5,5 min; então as amostras foram resfriadas a 50 °C também a uma taxa de 6 °C/min e permaneceram nesta temperatura até o final da análise (2 min). Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O programa Termoclines for Windows, versão 2.2 (Newport Scientific, Warriewood, Austrália) foi utilizado para o processamento dos resultados. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.2.8 Propriedades de gelatinização e retrogradação dos amidos

As propriedades térmicas dos amidos foram determinadas utilizando um Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, cidade, EUA) de acordo com o método descrito por Franco et al. (2010). Amostras de 2 mg (b.s.) dos amidos foram pesadas em porta amostra de alumínio, próprios para o equipamento. Água deionizada (6 µL) foi adicionada e os recipientes foram selados em prensa universal (Perkin Elmer, Norwalk, EUA). Os recipientes selados foram mantidos por 2 horas em temperatura ambiente e então aquecidos a uma razão de 10 °C/min de 25 a 125 °C. Um porta-amostra de alumínio vazio foi utilizado como referência. Cada recipiente de alumínio contendo a amostra de amido gelatinizado foi armazenado durante 10 dias a uma temperatura de 4 °C. As amostras foram então analisadas quanto às propriedades térmicas dos amidos retrogradados usando o mesmo aparelho e parâmetros. O aparelho foi calibrado com índio. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) dos amidos nativos e retrogradados foram determinados utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.2.9 Poder de Inchamento (PI) e Índice de Solubilidade (IS)

O poder de inchamento do amido foi determinado, em triplicata, seguindo o procedimento escrito por Leach, Mccowen e Schoch (1959). Alíquotas de 0,2 g (b.s.) de amido e 20 g de água destilada foram pesadas em tubo de centrifuga, e posterior agitação em vortex para homogeneização. O tubo contendo a mistura foi submetido a um banho com agitação a 55, 65, 75, 85 e 95 °C por 30 min. Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 min. Uma alíquota de 5 mL foi retirada do sobrenadante de cada amostra e colocada em placa de Petri previamente tarada e levada à estufa com circulação forçada de ar a 105 °C até peso constante. O sobrenadante remanescente foi cuidadosamente descartado e o material sedimentado foi pesado. O índice de solubilidade foi determinado pela equação 3 e o poder de inchamento pela equação 4:

$$\text{Sólidos Solúveis (\%)} = \frac{\text{peso de amido} \times 400}{\text{peso da amostra (bs)}} \quad (3)$$

$$\text{Poder de Inchamento (g/g)} = \frac{\text{peso de material sedimentado} \times 100}{\text{peso da amostra (bs)} \times 100\% - \text{solido solúveis}} \quad (4)$$

#### 4.2.2.10 Sinérese

A sinérese foi determinada utilizando a metodologia descrita por Eliasson e Ryang (1992), com algumas modificações. Suspensões de amido a 10 % preparadas em RVA foram transferidas para tubos de centrifugas e posteriormente foram condicionadas a três temperaturas: de 25 °C (BOD), 4 °C (câmara fria) e a -18 °C (freezer). As amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos e posteriormente foi medida quantidade de água liberada (sinérese), a cada 24 h por 5 dias. O cálculo da sinérese foi determinado a partir da equação 5:

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{\text{liquido separado (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

Peso da amostra = diferença entre o peso do tubo com a amostra e o peso do tubo vazio

Líquido separado= diferença entre o peso do tubo com gel e o peso do tubo (gel) sem a água.

### **4.2.3 Caracterização parcial das enzimas comerciais $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase**

#### 4.2.3.1 Determinação da atividade aparente enzimática

A determinação da atividade enzimática das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase foi efetuada através dos açúcares redutores pelo método colorimétrico do DNS (MILLER, 1959). Uma mistura com 0,9 mL de solução tampão 0,1 M contendo 0,5% de amido solúvel e 0,1 mL de enzima foi incubado a 55 °C por 10 min e a reação foi interrompida com 1 mL de DNS. Uma unidade de atividade da enzima (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto sob as condições de ensaio.

#### 4.2.3.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas

O efeito do pH sobre as atividades foi determinada incubando-se a enzima e a solução de substrato a 55 °C por 10 min. As soluções contendo 0,5% de amido solúvel foram preparadas em 0,1 M de tampão: acetato de sódio (pH 3,5 a 5,5) e fosfato de sódio (pH 6,0 e 6,5). Ao final do tempo de incubação 1 mL de DNS foi adicionado e determinado o teor de açúcar redutor produzido.

#### 4.2.3.3 Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas

A temperatura ótima foi determinada pela incubação das enzimas em solução 0,5 % de amido em tampão acetato pH 5,0. A mistura da reação foi mantida por 10 min, com variação de temperaturas de 50-100 °C para  $\alpha$ -amilase e 45- 70 °C para amiloglucosidase. Ao final do tempo de incubação, 1 mL de DNS foi adicionado e determinado o teor de açúcares redutor produzido.

#### 4.2.3.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada através da incubação das enzimas em seus respectivos pH ótimos nas temperaturas entre 50 °C a 90 °C durante 1 hora na ausência do substrato. A atividade enzimática remanescente foi determinada nas condições ótimas da enzima.

#### 4.2.4 Produção de etanol

##### 4.2.4.1 Pré-teste de hidrólise

Uma vez que foram avaliadas as melhores condições de temperatura e pH para as enzimas comerciais  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, o amido de mandioca foi utilizado visando as condições ideais de reação para a hidrólise enzimática do amido em estudo.

A liquefação do amido de mandioca foi realizada pesando 5, 10 e 20 g de substrato que corresponde a 5, 10 e 20 %, acrescentando-se 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5), aquecendo-se num banho de água em ebulição durante 30 min, e autoclavados a 120 °C durante 30 min para assegurar a gelatinização do amido. Para avaliar o efeito da carga enzimática de  $\alpha$ -amilase *Bacillus licheniformis* (Liquozyme Supra 2.2X Novozymes), foram adicionados 12 U/g e 130 U/g de amido (RUIZ et al., 2011) e a reação foi realizada em banho-maria a 60 °C com 200 rpm de agitação. Os tempos de hidrólise foram de 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 min e a concentração de açúcar redutor total liberados durante a reação foi avaliada empregando o método DNS (MILLER, 1959). Para quantificação dos açúcares redutores construiu-se uma curva de calibração de glicose lendo-se a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. O valor de dextrose equivalente (DE) foi calculado conforme a equação 6 (PONTOH; LOW, 1995).

$$DE = \frac{\text{açúcares redutores (g)}}{\text{sólidos totais (g)}} \times 100 \quad (6)$$

Após a liquefação, a concentração do substrato que apresentou melhores resultados de dextrose equivalente foi utilizada para a etapa de sacarificação, com adição de 250  $\mu$ L da enzima amiloglucosidase (AMG 300L) com atividade enzimática de 116 U/0,25 mL e pH 4,5, e

a reação foi realizada em banho-maria a 65 °C com agitação de 200 rpm. Os tempos de hidrólise empregados foram: 0, 2, 4, 6, e 24 horas. Os valores foram expressos em dextrose equivalente.

#### 4.2.4.2 Hidrólise enzimática

##### 4.2.4.2.1 Liquefação

A liquefação dos amidos de taioba e mandioca foi realizada pesando 20 g de substrato, acrescentando-se 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5), aquecendo-se num banho de água em ebulição durante 30 min, e autoclavados a 120 °C durante 30 min para assegurar a gelatinização dos amidos. A reação foi realizada em banho-maria a 60 °C com 200 rpm de agitação com adição 12 U/g da enzima  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* (Liquozyme Supra 2.2X Novozymes), empregando diferentes tempos de hidrólise: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min. A concentração de açúcar redutor totais liberados durante a reação foi avaliada empregando o método DNS (MILLER, 1959). Os valores foram expressos em dextrose equivalente (Idem 4.2.4.1).

##### 4.2.4.2.2 Sacarificação

O amido liquefeito foi resfriado até temperatura ambiente (25 °C), e o pH ajustado para 4,5 com tampão acetato de sódio a 0,1 M, antes da adição da enzima. Posteriormente, foram adicionados 250  $\mu$ L de enzima amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (AMG 300L) com atividade enzimática de 116 U/0,25 mL, a temperatura de 65 °C com rotação de 200 rpm, em diferentes tempos de hidrólise: 0, 2, 4, 6, e 24 h. A concentração de açúcares redutores totais liberados durante a reação foi avaliada empregando o método DNS (MILLER, 1959). Os valores foram expressos em dextrose equivalente (Idem 4.2.4.1).

##### 4.2.4.3 Preparo do inóculo

A levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* JP1 foi reativada em caldo YEPD, a 32 °C, 120 rpm durante 24 horas em estufa bacteriológica. Em seguida, a levedura foi transferida

para meio YEPD agar (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, dextrose 20 g/L e Agar 20 g/L), para fase de crescimento, permanecendo por mais 12 horas a 32 °C.

#### 4.2.4.4 Fermentação

O meio sacarificado foi suplementado com 0,2 g de sacarose, 0,1 g de amônio fosfato bibásico e 0,01 g sulfato de magnésio, e posteriormente transferiu-se 10 mL deste meio para o inóculo que foi incubado por 12 h a 32 °C. Após esse tempo, os 10 mL com meio e levedura foi transferido para 90 mL de meio sacarificado e suplementado, permanecendo incubado por 84 horas a  $32 \pm 1$  °C. A fermentação foi realizada em frascos de erlenmeyer de 125 mL acoplados a válvulas de anaeróbiose (Figura 12).



**Figura 12:** Meio sacarificado em estufa sob agitação acoplados a válvulas de anaerobiose.

O conteúdo fermentado foi centrifugado (10.000 rpm; 10 min) para separação das células, e o crescimento da levedura foi avaliado por meio da quantificação da biomassa celular, sendo o precipitado ressuspendido e homogeneizado com água destilada por três ciclos sucessivos. As células livres de resíduos do meio fermentado foram secas em estufa com circulação de ar a 60 °C até peso constante, e a biomassa expressa em mg/mL.

O sobrenadante foi utilizado para a análise de etanol produzido por meio da destilação de 10 mL do volume fermentado em microdestilador, em seguida a quantificação em densímetro digital (Antoon Paar, DMA 4500 M). Os parâmetros empregados para avaliar o desempenho desta etapa foram:

- Produção máxima de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ): quantificação da concentração total de etanol no meio reacional no final do processo fermentativo.
- Produtividade em etanol ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ): taxa de produtividade obtida pela correlação entre produção máxima de etanol em função do tempo total do processo, conforme a equação 6:

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (6)$$

Sendo:  $P_f$ : concentração do produto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no final da reação

$P_0$ : concentração do produto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no início da reação

$t_f$ : tempo total de fermentação (horas)

- Rendimento de conversão de substrato em produto: fator de conversão que correlaciona a concentração de produto formado em relação à concentração de substrato consumido, segundo a equação 7:

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (7)$$

Sendo:  $S_0$ : concentração de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no início da reação

$S_f$ : concentração do substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no final da reação

- Eficiência da fermentação (E%): índice percentual que faz referência à formação de etanol no processo em relação à concentração teórica obtida em reação estequiométrica a partir da glicose, conforme a equação 8:

$$E (\%) = \frac{(P_f - P_0)100}{(S_0 - S_f)0,511} \quad (8)$$

O consumo dos açúcares foi determinado por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das amostras filtradas foram automaticamente injetadas no equipamento constituído por uma coluna

de troca aniônica CarboPac PA-200 (250 x 3 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200. A forma de onda empregada foi a *standard quadruple* com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t1 = 0,40 s); E2 = -2,00 V (t2 = 0,02 s); E3 = 0,60 V (t3 = 0,01 s); E4 = -0,10 V (t4 = 0,06 s). Os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (1M acetato de sódio e 100 mM NaOH) com fluxo de 0,5mL/min e temperatura de 30 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N<sub>2</sub>. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min: gradiente linear de 100 mM de hidróxido de sódio; 10 - 25 min: gradiente linear de 70 a 130 mM de acetato de sódio e constante de 100 mM de hidróxido de sódio; 25-30 min: gradiente linear de 100 mM de hidróxido de sódio. Uma mistura de maltodextrinas como padrão (grau de polimerização 1-7) foi usada para identificação dos açúcares nas concentrações de 2 a 70 µg. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA).

### **4.3 Análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas no mínimo em duplicata. O software Statistica para Windows (v. 5.0, Statsoft, EUA) foi empregado para analisar valores médios usando análise de variância (ANOVA). As diferenças foram avaliadas utilizando o teste t com o ajuste de Tukey. O nível de significância foi ajustado para um valor de  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS**

#### **5.1.1 Composição química dos amidos**

Os resultados da composição química dos amidos nativos de taioba e mandioca estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que o teor de umidade foi de 12,53 % e 9,62 %, para os amidos de taioba e mandioca, respectivamente. Os valores obtidos neste trabalho foram inferiores ao encontrado por Pérez, Schultz e Delahaye (2005) para taioba (13,43 %) e mandioca

(13,63 %). O nível de umidade depende em grande parte do método, extensão da secagem e umidade na atmosfera circundante (LAWAL, 2005).

**Tabela 1** – Composição química<sup>a</sup> dos amidos isolados.

<b>Amido</b>	<b>Umidade(%)</b>	<b>Cinzas*(%)</b>	<b>Proteína*(%)</b>	<b>Lipídeos*(%)</b>	<b>Fósforo*(%)</b>
Taioba	12,53 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,045±0,001 <sup>a</sup>
Mandioca	9,62 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,012±0,001 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Média de três replicatas seguida de desvio padrão. \* Dados apresentados em base seca. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ )

Os valores do teor de proteínas para os dois amidos foram baixos ( $\leq 0,2\%$ ), teores elevados de proteínas influenciam no processo de gelatinização do amido, pois competem junto com o amido pela água. Os teores de proteína presentes nos amidos de taioba e mandioca são semelhantes aos relatados na literatura (LAWAL 2005; LONDONO-RESTREPO et al., 2014; ZHU, 2015). Entretanto, ao comparar com amidos de batata-doce (0,28-0,76 %), inhame (3,23 %), taro (1,31 %), batata (0,30-0,61 %), tapioca (0,51 %) e milho (1,21%) (MISHRA; RAI, 2006; APRIANITA et al., 2009; ALVANI; TESTER; SNAPE, 2011; ABEGUNDE et al., 2013).

Como pode ser observado na Tabela 1, o amido de taioba apresenta teor de lipídeo de 0,26 % e mandioca com valor de 0,11%. Os valores de lipídeos do amido nativo de taioba encontrado na literatura estão entre 0,1 % (PERÉZ; SCHULTZ; DELAHAYE, 2005) e 0,40 % (GUNARATNE; HOOVER, 2002; LAWAL 2005). Gunaratne e Hoover (2002) reportaram que o amido de taioba diferiu dos outros amidos em apresentar um teor significativamente maior de lipídeos (0,09-0,40 %) e uma proporção muito maior de cadeias de amilose com complexos lipídicos, entretanto o teor lipídico total estava na faixa mencionada para a maioria dos amidos de tubérculos e raízes (0,1-1,14%).

O amido de taioba apresentou maior teor de fósforo (0,045%) que o amido de mandioca (0,012 %). A quantidade de fósforo foi maior no amido de batata (0,10%) quando comparado com inhame (0,03%), taioba etaro (0,02%) e mandioca (0,01%) (GUNARATNE; HOOVER, 2002).O fósforo nos amidos de raízes e tubérculos é encontrado na forma de monoésteres de fosfato, com um nível excepcionalmente elevado em batata (~ 0,090%), ligado covalentemente à amilopectina, interferindo nas propriedades funcionais do amido (BULÉON et al.,1998; PEREZ-REA et al., 2013). As diferenças no teor de fósforo em amidos variam com a fonte botânica, maturidade e condições de crescimento da planta (KASEMSUWAN; JANE, 1996).

Os constituintes menores (proteínas, lipídeos e cinzas) são substâncias que fazem parte da própria planta e a quantidade destes no amido depende da composição da planta e do método de extração e purificação do amido (FRANCO et al., 2001).

De acordo com Leonel (2005) as túberas de taioba apresentaram valores de 3,18 % de proteínas, 1,17 % de cinzas e 0,11 % de lipídeos, os resultados obtidos neste trabalho indicam que durante o processo de isolamento houve purificação do amido de taioba.

### **5.1.2. Forma e distribuição de tamanho de grânulos dos amidos**

Os grânulos de amidos de diferentes espécies têm formas e tamanhos diferentes, tais como poliédricos, poligonais, elipsoidais, triangulares, esféricos, lenticulares e ovais e o tamanho do grânulo pode variar de 1 a 110  $\mu\text{m}$ , sendo considerados pequenos os grânulos de tamanho entre 1 e 20  $\mu\text{m}$  e grandes os que variam entre 20 e 110  $\mu\text{m}$  (SINGH et al., 2003; SHARLINA et al., 2017). O tamanho do grânulo do amido é considerado uma característica importante, que pode influenciar as propriedades físico-químicas tais como o poder de inchamento, a claridade de pasta e a capacidade de ligação à água (SINGH et al., 2003).

Diferenças entre o maior e o menor diâmetro apontam para formato mais regular dos grânulos de amido, parâmetro que indica regularidade do tamanho, ou seja, baixa variabilidade das medidas (FRANCO et al., 2001; LEONEL, 2007).

O amido de mandioca apresentou tamanho médio maior que o amido de taioba, entre os diâmetros, entretanto, a diferença entre o tamanho maior e o menor para ambas amostras foram praticamente iguais, sendo 0,08 para o amido de mandioca e 0,07 para o amido de taioba, e portanto, não houve diferença na regularidade do tamanho entre os grânulos (Tabela 2).

Esses valores são menores que os obtidos por Falade e Okafor (2013) que encontraram para os amidos de taioba, tamanho médio dos diâmetros entre 9,71-10,76  $\mu\text{m}$  (diâmetro maior) e 6,48-8,45  $\mu\text{m}$  (diâmetro menor), sendo que essas variações no tamanho podem ser devidas a diferenças genéticas e/ou condições ambientais, e de isolamento do amido.

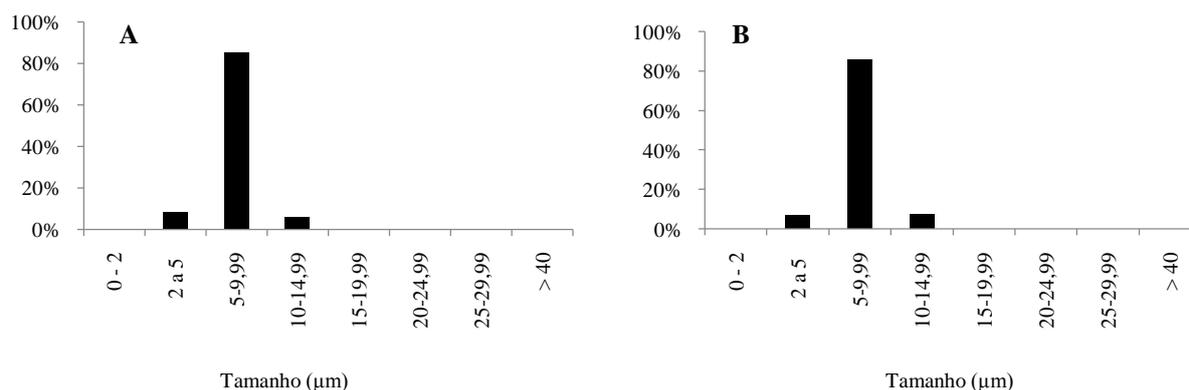
**Tabela 2-**Tamanho médio dos grânulos dos amidos de taioba e mandioca.

Amido	Tamanho médio*( $\mu\text{m}$ )		
	Menor	Maior	Diferença**
Taioba	7,20 $\pm$ 1,77	7,28 $\pm$ 1,75	0,08
Mandioca	15,18 $\pm$ 3,97	15,25 $\pm$ 3,88	0,07

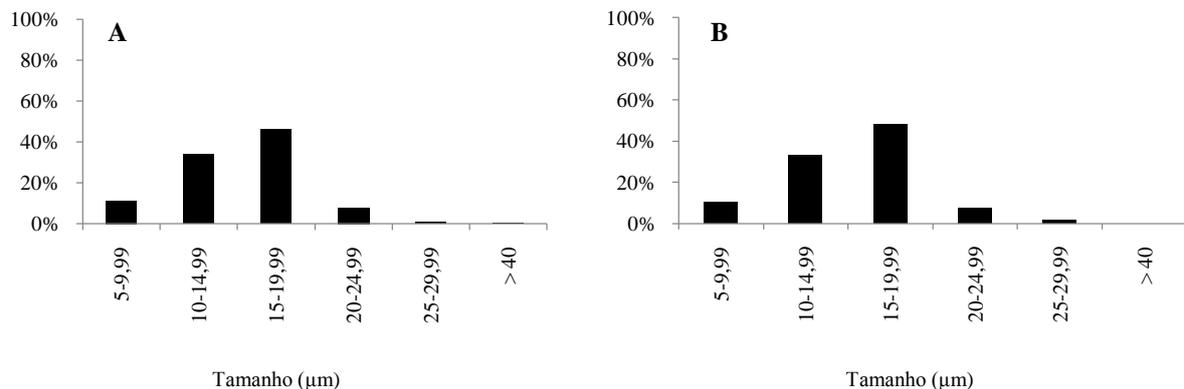
\*Média dos diâmetros

\*\* Diferença entre os diâmetros

Analisando o perfil de distribuição de tamanho dos grânulos de taioba e mandioca (Figura 13 e 14) e microscopia eletrônica de varredura (Figura 15), pode-se observar que os grânulos de amido de taioba têm forma poliédrica, oval e irregular nas extremidades, apresentando maior quantidade de grânulos com diâmetro menor que 10  $\mu\text{m}$  (85,4%), e o intervalo de tamanho de grânulos mais estreito (2-14,55  $\mu\text{m}$ ), com distribuição homogênea de tamanhos. Por outro lado, grânulos de amido de mandioca apresentaram forma arredondada, truncada nas extremidades e maior quantidade de grânulos com diâmetro entre 15-19,99  $\mu\text{m}$  (47,8%) com intervalos de tamanhos de grânulos mais largo (5-29,99  $\mu\text{m}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por Pérez; Schultz; Delahaye (2005); Leonel (2007); Nwokocha et al. (2009); Gomand et al. (2010) e Ladeira; Souza; Pena, (2013).



**Figura 13:** Perfil de distribuição do diâmetro granular do amido de taioba. A: diâmetro menor; B: diâmetro maior



**Figura 14:** Perfil de distribuição do diâmetro granular do amido de mandioca. A: diâmetro menor B: diâmetro maior

Srichuwong et al. (2005) relataram que o tamanho e a forma dos grânulos dos amidos eram diversos e específicos para cada espécie, encontrando tamanho médio grande para os amidos de taioba (20,7 μm) e mandioca (23,2 μm).

Ao comparar os dados obtidos neste trabalho com os reportados na literatura para outras fontes botânicas, valores de diâmetro médio maiores foram encontrados para amido de batata (25,8 μm), feijão vermelho (26,54 μm), lentilha (21,08 μm) e menores para os amidos de arroz (4,7 μm), taro (5,3 μm) e inhame (4,9 μm) (SRICHUWONG et al., 2005; ALVANI; TESTER; SNAPE, 2011; MA et al., 2017).

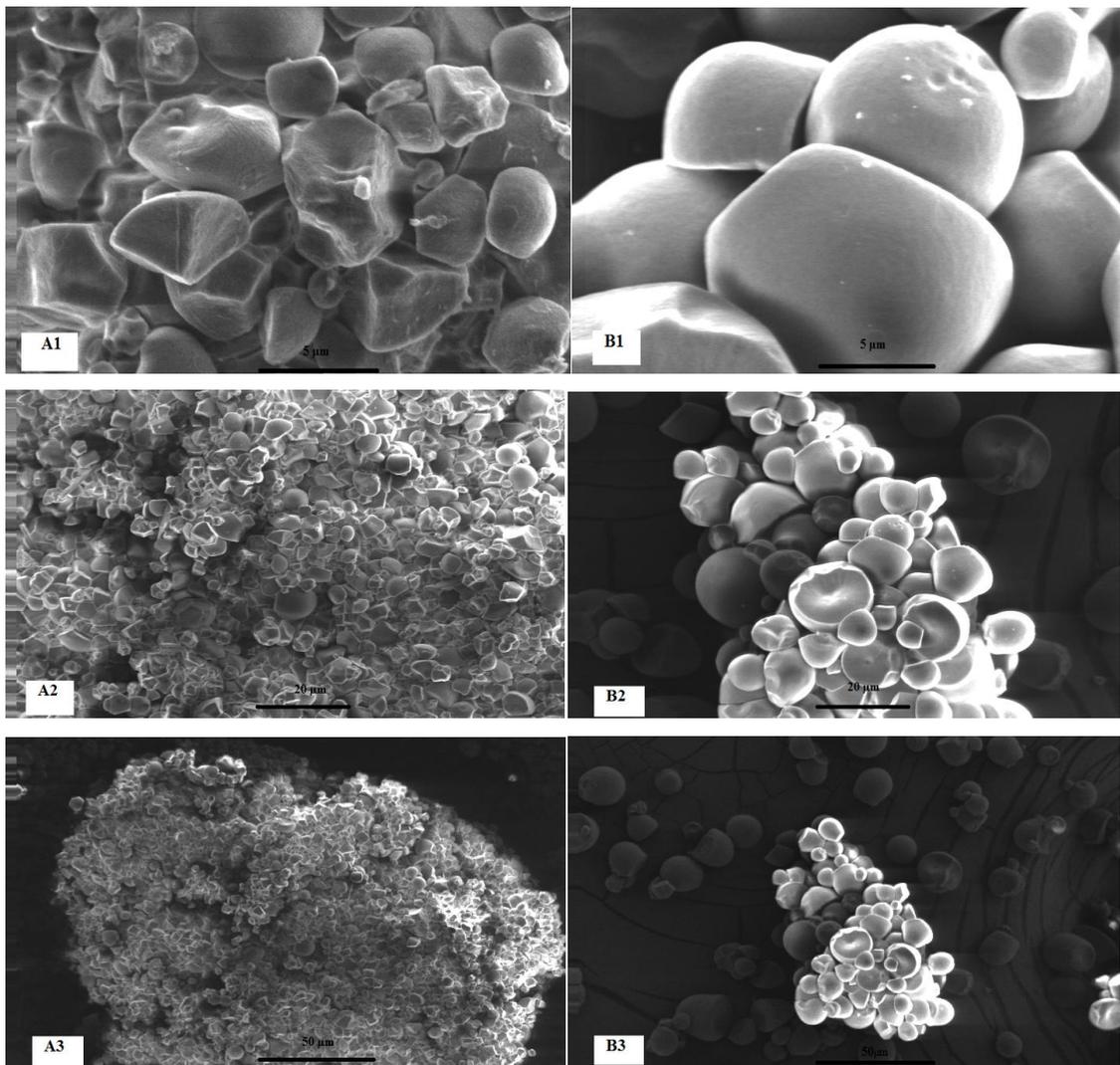
As diferenças no tamanho dos grânulos dos amidos de uma mesma espécie são presumivelmente atribuídas às diferenças de cultivares, às condições de crescimento e à fisiologia das plantas. Além disso, o tamanho do grânulo de amido desempenha um papel significativo nas propriedades de pasta dos amidos (ABEGUNDE et al., 2013).

Ao analisar a superfície dos grânulos de taioba e mandioca, por microscopia eletrônica de varredura (Figura 15), não foi possível detectar a presença de fissuras ou rupturas, sugerindo que durante o isolamento e secagem não ocorreu danos às suas estruturas granulares.

Gunaratne e Hoover (2002) reportaram que grânulos de amidos apresentaram formatos variados como ovais para o amido de taro (*Dioscorea alata* e *Alocassia indica*), redondo para o amido de mandioca (*Manihot esculenta*), redondo para o amido de batata (*Solanum tuberosum*) e poligonal para o amido de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) com dimensões na faixa de 3-110 μm e superfície dos grânulos lisa não apresentando qualquer evidência de fissuras. A origem das fissuras ou rupturas na superfície do amido é variada, podem aparecer como

resultado de processos naturais que ocorrem no tecido vegetal, bem como durante o tratamento mecânico ou enzimático (SUJKA; JAMROZ, 2007).

Singh e Singh (2001) alegaram que a morfologia dos grânulos de amido depende da bioquímica do cloroplasto ou amiloplasto e da fisiologia da planta.



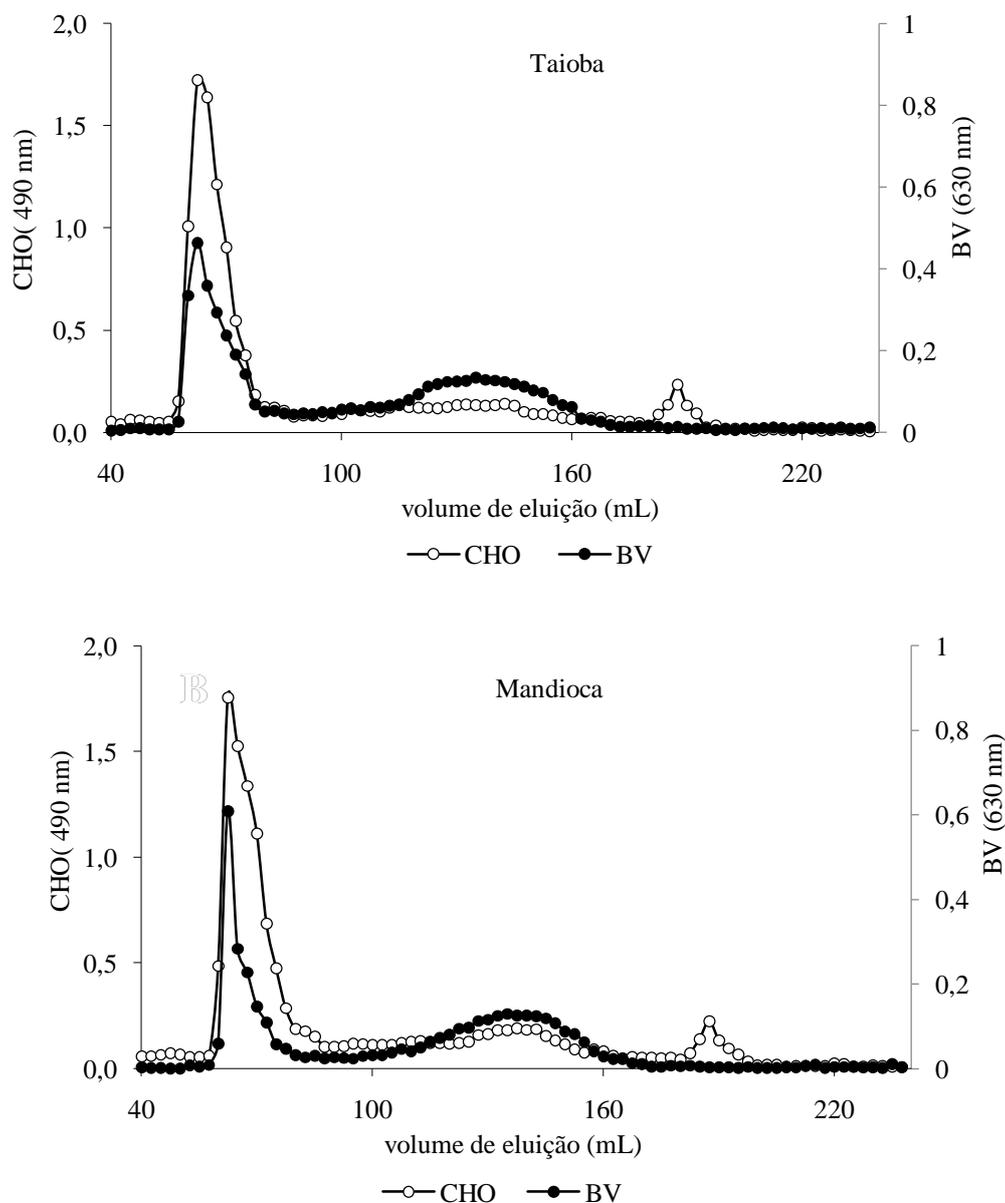
**Figura 15:** Micrografias dos grânulos de amido de Taioba (A1 = 5000 x; A2 = 1000 x ; A3 = 500 x) e Mandioca (B1 = 5000 x; B2 = 1000 x ; B3 = 500 x) observados em microscópio eletrônico de varredura.

### 5.1.3 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos de taioba e mandioca por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os perfis de distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos nativos estão apresentados na Figura 16. O primeiro pico corresponde à amilopectina, que por apresentar maior massa molecular eluiu no volume vazio da coluna. O segundo pico, que apresentou maior valor de *Blue value*, relaciona-se à amilose e por último tem-se a glicose que corresponde ao final da eluição.

Os resultados mostraram que a proporção da relação entre os valores de *Blue value* e carboidratos totais (BV/CHO) da amilopectina foram eluídos no volume de 62,5 mL, para ambos os amidos, com pico da mandioca maior (0,34) que a da taioba (0,26), podendo ser devido a maiores proporções de cadeias de amilopectina longas presentes no amido de mandioca quando comparado com a taioba. Maiores proporções de BV/CHO na fração de amilopectina podem sugerir um maior número de cadeias laterais longas na molécula desse polissacarídeo, uma vez que essas longas ramificações, de forma semelhante à amilose, podem ligar iodo e aumentar a afinidade com iodo (ALVES et al., 2014). Isso poderá ser confirmado pelo maior valor de afinidade por iodo para a amilopectina pura observada nos resultados de determinação do teor de amilose absoluta. Peroni, Rocha e Franco (2006) encontraram valores superiores aos obtidos neste trabalho para esta relação para amidos de canna (1,01), mandioca (0,38), araruta (0,45), batata doce (0,51), gengibre (0,68) e inhame (0,68).

Ao analisar os cromatogramas (Figura 16), observa-se que o amido de taioba apresentou o segundo pico (amilose) eluído a 132,5 mL. Este pico que foi eluído em um volume menor que aquele no amido de mandioca (137,5 mL), indicativo que o amido de taioba apresenta maior massa molecular. O pico de amilose do amido de mandioca mostrou-se mais resolvido que o de taioba, isso indica maior homogeneidade no tamanho molecular da amilose do amido de mandioca. Moraes, Alves e Franco (2013) relataram que o amido de mandioquinha-salsa exibiu um pico de amilopectina mais elevado do que o amido de mandioca, por outro lado, o pico de amilose foi menor e mais largo que o da mandioca, com indicativo que o amido de mandioquinha-salsa tem um menor teor de amilose com uma massa molecular mais polidispersa.

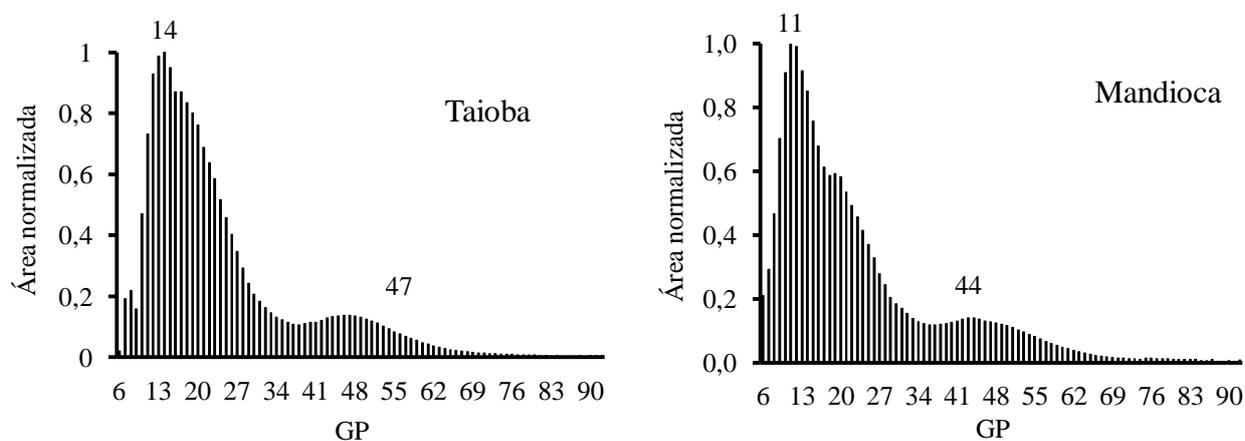


**Figura 16:** Perfis de eluição dos amidos nativos de taioba e mandioca obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (○) carboidratos totais; (●) Blue value.

#### 5.1.4 Distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos

As cadeias ramificadas da amilopectina podem ser classificadas de acordo com o grau de polimerização (GP) em: cadeias A (GP 6-12), cadeias B1 (GP 13-24), cadeia B2 (GP 25-36) e cadeias B3 ou + (GP  $\geq 37$ ), dependendo do número de “clusters” de que as mesmas fazem parte (LIN et al., 2016). As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais resultantes

da desramificação dos amidos com isoamilase estão apresentadas na Figura 17 e os resultados resumidos na Tabela 3.



**Figura 17:** Distribuição normalizada do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de taioba e mandioca desramificados com isoamilase, determinada por HPAEC-PAD.

Os amidos apresentaram uma distribuição bimodal com um pico principal no GP 14 e 11 para os amidos de taioba e mandioca, respectivamente, e um segundo pico nos GP 47 e 44 para os amidos de taioba e mandioca, respectivamente.

**Tabela 3-** Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos\*

	Comprimento de cadeia (%)				GP	Maior GP detectado
	GP (6-12)	GP (13-24)	GP (25-36)	GP ( $\geq 37$ )		
Taioba	15,09 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	52,73 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	15,65 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	16,71 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	23,91 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	92
Mandioca	26,10 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	42,40 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	13,90 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	17,60 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	23,10 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	92

\*Média de duas replicatas seguida do desvio-padrão. GP: grau de polimerização. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ )

O amido de mandioca apresentou alta proporção de cadeias curtas (26,1%) e a quantidade de cadeias longas foi de 17,6%, confirmando a característica do padrão cristalino C<sub>A</sub> desse amido. O amido de taioba apresentou menores proporções de cadeias curtas (15,09 %) e longas (16,71 %) quando comparado com a mandioca, entretanto com maior proporção de cadeias ramificadas intermediárias (GP13-24), característico do padrão A. Zhang et al. (2016) relatam que os grânulos de amido do tipo A de duas variedades de trigo continham menos

cadeias de ramificação curta (GP 6-12) e proporção mais elevada de cadeias intermediárias (GP 13-24) do que os grânulos tipo B. Estes dados indicam que as moléculas de amilopectina dos grânulos de tipo A e B têm estruturas finas distintas e são controladas geneticamente durante a sua biossíntese.

Srichuwong et al (2005) relataram que amidos de mandioca e taioba apresentaram maior proporção de cadeias curtas e menor proporção de cadeias longas, ambos com padrão cristalino tipo A. O amido de mafafa (*Xanthosoma robustum*) apresentou alta proporção de cadeias curtas com GP 6-12 (31,3 %), e baixa proporção de cadeias longas (12,8 %) (LONDONO-RESTREPO et al., 2014) mas o padrão cristalino desse amido não foi identificado pelos autores.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yoo et al. (2009), sendo que os amidos do tipo B são conhecidos por terem menores percentagens de cadeias curtas (GP 6-12) e maiores de cadeias longas ( $GP \geq 37$ ).

Moraes, Alves e Franco (2013) relataram que o amido nativo de mandioquinha-salsa, com padrão cristalino tipo B, apresentou maior proporção de cadeias curtas e pequena quantidade de cadeias intermediárias, com defeito na estrutura cristalina, representado pelo aparecimento de um ombro na sua distribuição de comprimentos de cadeias. Estes resultados sugeriram que a grande quantidade de cadeias curtas encontradas no amido não é capaz de formar duplas hélices estáveis, o que faz com que esse amido apresente uma capacidade menor de manter a integridade do grânulo. Esses resultados confirmam trabalhos anteriores que descreveram que os amidos com maior proporção de cadeias curtas não são capazes de formar cristais e conseqüentemente não são empacotados mais fortemente, apresentando defeito na sua estrutura cristalina (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007; CAMPANHA, 2010). O amido de taioba não apresentou ombro na sua estrutura, sugerindo empacotamento das duplas hélices estáveis.

O comprimento médio das cadeias de amilopectina dos amidos de taioba e mandioca foram similares, com valores em torno de 23,9 e 23,1 %, respectivamente.

Demiante et al. (2016) estudando variedades de feijão observaram diferenças nas cadeias longas de amilopectina ( $GP > 37$ ) com variação entre 19,60 a 21,25 % assim como no comprimento médio das cadeias (10,31 a 13,85 %), apresentaram influência nas propriedades de pasta dos amidos.

A maior proporção de cadeias longas de amilopectina no amido de mandioca confirma os resultados obtidos no GPC, ou seja, essas cadeias são capazes de se complexar com iodo fornecendo uma maior relação BV/CHO que foi de 0,34 para o amido de mandioca. Essas cadeias longas de amilopectina também podem se ligar com iodo e superestimar o valor de amilose.

### 5.1.5 Afinidade por iodo e teor de amilose aparente e absoluto

Os valores encontrados para a afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos de taioba e mandioca são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4-**Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos de taioba e mandioca.

Amido	Afinidade por iodo (%) <sup>a</sup>		Teor de amilose (%) <sup>b</sup>	
	Amido	Amilopectina	Aparente <sup>c</sup>	Absoluta <sup>d</sup>
Taioba	4,36± 0,16 <sup>a</sup>	1,17± 0,08 <sup>b</sup>	21,80	16,96
Mandioca	4,73± 0,15 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	23,65	14,56

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas seguidos do desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup>Afinidade por iodo da amilose pura foi considerada 20% (TAKEDA; HIZUKURI; JULIANO, 1987).

<sup>c</sup> % amilose aparente =  $(AI_A/0,20)$ , onde  $AI_A$  é a afinidade por iodo do amido desengordurado.

<sup>d</sup>% amilose absoluta =  $(AI_A - AI_{AP})/[0,2 - (AI_{AP}/100)]$

O amido de mandioca apresentou maior teor de amilose aparente (23,65 %) quando comparado com o amido de taioba (21,80 %). Este resultado é semelhante aos apresentados por Lawal (2003) que encontrou 22,7 % e 23,6 % de amilose aparente em amidos nativos de taioba e mandioca, respectivamente, mas diferiram do valor obtido por Srichuwong et al (2005), para amido de mandioca que teve um valor de 17,9 %.

A diferença nos teores de amilose aparente reportados na literatura para amidos de diferentes fontes botânicas como batata (25,2 a 29,1%), batata-doce (13,33 a 26,83%), taro (5,59 a 14,45 %), inhame (14,60 a 31,33 %), feijão (33,5 a 40,24 %), taioba (16,01 % a 33,77 %) e mandioca (17,9 a 23,6 %) são atribuídas a diferenças genótípicas, comprimento das cadeias laterais da amilopectina e fatores ambientais, assim como os procedimentos de isolamento de amido e métodos analíticos utilizados para determinar o teor de amilose (SINGH; McCARTHY;

SINGH, 2006; APRIANITA et al., 2009; NUWAMANYA et al., 2010; ALVANI; TESTER; SNAPE, 2011; ROLLAND-SABATÉ et al., 2012; ABEGUNDE et al., 2013; FALADE; OKAFOR, 2013; ASCHERI et al., 2014; MA et al., 2017).

Sabe-se que quanto maior a afinidade por iodo (IA) maior será o teor de amilose, sendo observado na Tabela 4 que os amidos de taioba e mandioca apresentaram valores de afinidades com iodo semelhantes (4,36 e 4,73, respectivamente), entretanto o valor da afinidade por iodo da amilopectina isolada do amido de mandioca foi maior (2,12 %) que aquele do amido de taioba, com teores de amilose absoluto de 16,96 % para taioba e 14,56 % para mandioca. Esse valor pode ser explicado pelo fato do amido de mandioca apresentar uma proporção maior de cadeias laterais longas de amilopectina, as quais podem interagir com o iodo e superestimar o teor de amilose (aparente) do amido (JANE et al., 1999; FRANCO et al., 2002; YOO et al., 2009).

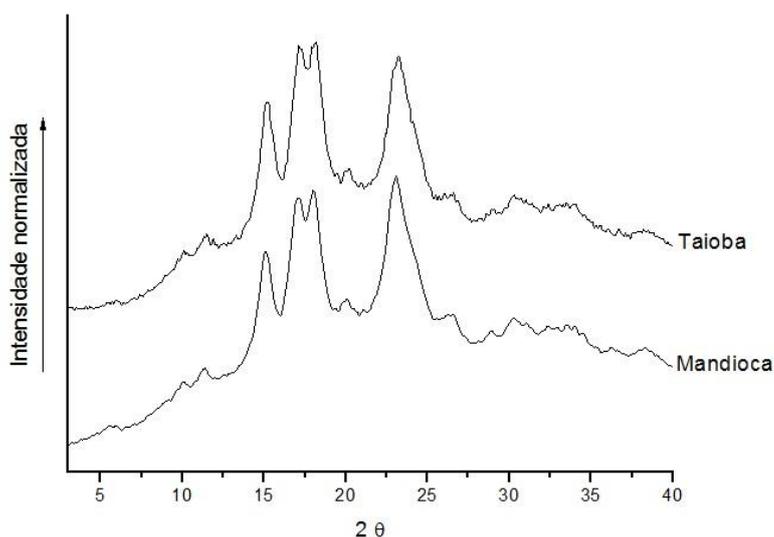
Perez-Rea et al. (2013) observaram que os amidos de cana (*Canna indica*), mandioca (*Manihot esculenta*) e taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) apresentaram uma grande diferença nos teores de amilose (48, 23 e 15%, respectivamente), sugerindo que o amido de cana, que apresenta um padrão de raios X do tipo B, tem uma maior proporção de cadeias longas de amilopectina do que os amidos de mandioca e de taioba (padrão tipo-A).

### 5.1.6 Difração de raio-X e cristalinidade relativa

O amido de taioba apresentou padrão cristalino tipo A, com picos principais em  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  e  $23^\circ$  em  $2\theta$ . O amido de mandioca também exibiu esses picos, entretanto um pequeno pico a  $5,6^\circ$  foi observado, característico do alomorfo B, o que possibilitou classificar esse amido como padrão tipo  $C_A$  (Figura 18). O padrão cristalino tipo C corresponde a uma mistura de cristais tipo A e B e dependendo da maior quantidade de cristais A ou B pode ser  $C_A$ ,  $C_B$ , ou  $C_C$  (DENARDIN; SILVA, 2009; ZHU, 2015). Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes, Alves e Franco (2013) para amido de mandioca e Lawal (2005) para amido de taioba.

O padrão cristalino do tipo A, também presente em cereais, é caracterizado por uma dupla hélice formada por moléculas de amilopectina compactadas em um arranjo monociclo (ALVES et al., 2014). Embora, o padrão de difração tipo B seja característico de raízes e tubérculos, o resultado obtido neste trabalho é consistente com algumas exceções apresentadas na literatura, que incluem os amidos de batata doce e inhame (A, C), mandioca (A, C,  $C_A$ ), cará-

doce, erva-de-elefante, taioba, araruta, taro (A) (SRICHUWONG et al., 2005; LAWAL, 2005; ALVANI; TESTER; SNAPE, 2011; SHARLINA et al., 2017).



**Figura 18:** Diffractogramas de raios-X dos amidos de taioba e mandioca.

A cristalinidade relativa é definida como a razão entre a área do pico de difração (composta principalmente de cadeias laterais de amilopectina) e a área de difração total (composta pela área da região cristalina e a área da região amorfa), sendo os principais componentes de regiões amorfas, os pontos de ramificação e a amilose. Portanto, a cristalinidade dos grânulos de amido é medido por difracção de raios-X emitidos pela presença das hélices duplas alinhadas e compactadas formados pela amilopectina ramificada (ZOBEL, 1988; ASCHERI et al., 2014).

O amido de taioba apresentou maior cristalinidade relativa (38,3%) que o amido de mandioca (36,1%), podendo ser atribuída a maior proporção de cadeias intermediárias da amilopectina (GP 13-24) e padrão cristalino A do amido de taioba. Os valores de cristalinidade relativa para amido de mandioca são semelhantes aos obtidos por Rolland-Sabaté et al. (2012).

Alvani, Tester e Snape (2011) ao estudarem os amidos nativos de diferentes cultivares de batata obtiveram percentagem de cristalinidade variando de 29,3 a 31,2 %, considerando essa variação pequena e descreveram que os valores da literatura para a cristalinidade do amido variam de 15% a 45% dependendo não apenas da origem e da hidratação do amido, mas também da técnica utilizada. Assim, torna-se difícil comparar diferentes resultados na literatura,

porque a umidade da amostra é fator preponderante para a resolução dos picos, sendo necessário que seja feita nas mesmas condições.

Yonemoto, Calori-Domingue e Franco (2007) citam que o teor de amilose correlaciona-se negativamente com o grau de cristalinidade dos amidos. Por outro lado, Sharlina et al (2017) estudando amido de *Dioscorea pyrifofoia* verificaram que o grau de cristalinidade era de 23,3 %, considerado baixo pra espécie que apresenta em média 44 % de amilose. Esses autores atribuíram esse baixo valor na cristalinidade relativa à orientação e interação das duplas hélices da amilopectina dentro do domínio cristalino.

Srichuwong et al (2005) descreveram que os amidos de diferentes fontes botânicas apresentaram cristalinidade relativa variando 31,0-37,1% (padrão A), 27,2-29,8% (padrão B) e 27,8% (padrão C), sugerindo que as cadeias curtas do amido tipo A, que estão em maior quantidade nestes amidos, são mais densamente empacotadas em estruturas helicoidais. Entretanto, a grande proporção de cadeias curtas (GP 6-12) da amilopectina do amido de mandioca conduziu a uma estrutura cristalina defeituosa, o que resultou numa menor porcentagem de cristalinidade.

### **5.1.7 Propriedades de Pasta**

Quando o amido é aquecido em excesso de água com agitação, ocorre inchaço irreversível de grânulos de amido, sendo o mesmo acompanhado por lixiviação de moléculas de amilose linear e possivelmente solubilização de moléculas de amilopectina de cadeias ramificadas, resultando na formação da pasta de amido (GANI et al., 2017).

As propriedades de pasta dos amidos de taioba e mandioca, incluindo temperatura de pasta, pico de viscosidade, viscosidade de quebra, viscosidade final e setback, determinadas através do RVA, estão apresentadas na Tabela 5. O perfil de viscosidade dos amidos está apresentado na Figura 19.

O pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também a presença de alguns grânulos intactos (MENDES; BORA; RIBEIRO, 2012).

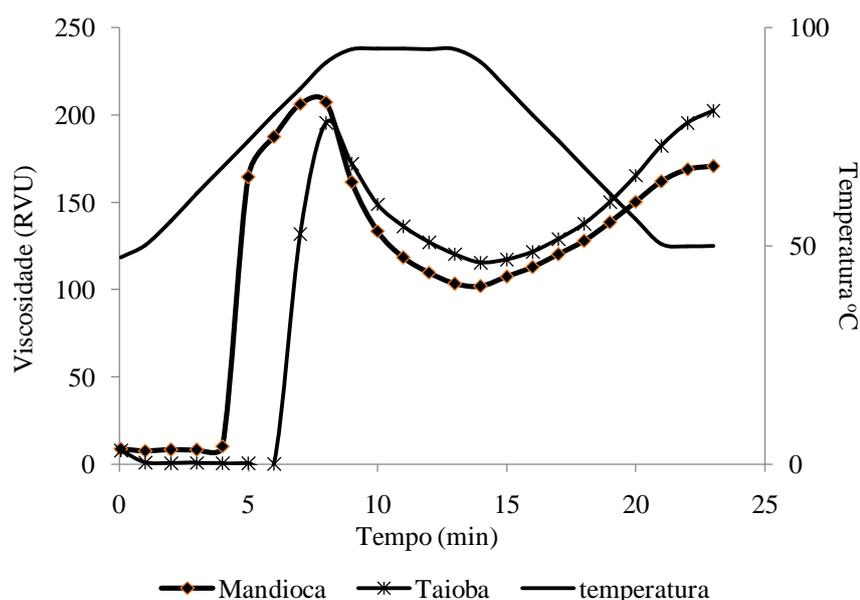
O amido de taioba apresentou maior temperatura de pasta (82,9 °C) que o amido de mandioca (68,4 °C), entretanto o amido de mandioca teve maior viscosidade de pico (206

RVU), podendo este fato ser atribuído à maior proporção de cadeias longas da amilopectina deste amido. De acordo com Franco et al. (2002) amidos que apresentaram maior proporção de cadeias ramificadas longas de amilopectina exibiram maior viscosidade de pico e menores temperaturas de pasta.

**Tabela 5**-Propriedades de pasta dos amidos de taioba e mandioca<sup>a</sup>.

Amido	Tpasta (°C)	Viscosidade (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	Setback
Taioba	82,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	195 ± 0,0 <sup>b</sup>	78 ± 4,2 <sup>b</sup>	196 ± 2,1 <sup>a</sup>	84 ± 2,1 <sup>a</sup>
Mandioca	68,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	206 ± 0,0 <sup>a</sup>	157 ± 7,6 <sup>a</sup>	154 ± 2,6 <sup>b</sup>	63 ± 0,1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Valores médios obtidos de três repetições seguidos dos desvios-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente (p<0,05).



**Figura 19:** Perfil viscoamilográfico dos amidos de taioba e mandioca.

Londono-Restrepo et al (2014) verificaram que o amido de *Xanthosoma robustum* teve baixa temperatura de pasta e alta viscosidade de pico, relacionando com maior proporção de cadeias ramificadas longas de amilopectina.

Daiuto e Cereda (2006), encontraram para amido de taioba menor temperatura de pasta (74,4 °C), quando comparado com os amidos de gengibre (89,4 °C), inhame (86,9 °C), açafrão (83,3 °C) e taro (76,8 °C). No trabalho de Shirai et al. (2007), o amido nativo de mandioca

apresentou temperatura de pasta semelhante ao obtido neste trabalho (66,7 °C ), sendo que os valores de milho ceroso e milho regular foram de 71,1 °C e 82,6 °C, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores que chegaram a conclusão que amidos que têm temperatura de pasta mais baixa, pode ser devido a menor resistência à dissociação das ligações de hidrogênio intramoleculares e maior facilidade de expansão (SILVA et al., 2006; MENDES; BORA; RIBEIRO, 2012; PEPE et al., 2015).

A temperatura de pasta também é influenciada pelo tamanho dos grânulos de amido, sendo que os grânulos pequenos são mais resistentes à ruptura e à perda de ordem molecular, o que pode ter contribuído para a diferença entre a temperatura de pasta dos amidos de taioba e mandioca. Estes resultados corroboram com os obtidos por Daiuto e Cereda (2006) e Falade e Okafor (2013).

A viscosidade de quebra é uma estimativa da resistência da pasta à desintegração em resposta ao calor e cisalhamento. Os amidos que apresentam a viscosidade de pico mais baixas mostraram uma viscosidade de quebra menor, ou seja, uma maior estabilidade ao calor e atrito (FALADE; OKAFOR, 2013).

O amido de taioba teve uma menor viscosidade de quebra, indicativo de um amido com maior estabilidade a altas temperaturas e agitação mecânica que o de mandioca, por outro lado, com uma maior tendência a retrogradação (setback), provavelmente devido ao maior teor de amilose absoluto deste amido quando comparado ao de mandioca. Yoo et al. (2009) e Ma et al. (2017) também relataram que os amidos que apresentaram baixa viscosidade de pico e quebra pode ser devido a presença de fortes forças de coesão dentro dos grânulos, assim como um teor de amilose absoluto maior, proporcionando uma grande tendência a retrogradação, resultado de moléculas de amilose que se reorganizam durante o resfriamento da pasta formando um gel. Os amidos com maiores teores de amilose, lipídeos e fosfolipídeos exibem elevadas temperaturas de pasta, baixo pico de viscosidade, maior resistência à quebra e alta tendência a retrogradação (FRANCO et al., 2002; HUANG et al., 2015).

As propriedades de pasta do amido são, portanto, afetadas pelo tamanho do grânulo de amido, pelo teor de amilose e lipídeo, e pela estrutura da amilopectina. A amilopectina é a principal responsável pelo inchaço dos grânulos, enquanto a amilose e os lipídeos restringem o inchaço (ZHANG et al. 2016).

### 5.1.8 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas de gelatinizaçãodos amidos de taioba e mandioca, determinadas por DSC, estão apresentados na Tabela 6. As temperaturas iniciais de gelatinização, determinadas por DSC, dos dois amidos estudados foram menores do que suas temperaturas de pasta, obtidas com o RVA. Isso por que o DSC é capaz de detectar quando os primeiros grânulos começam a se desorganizar e registra a temperatura inicial de gelatinização, ou seja, há maior sensibilidade por parte do aparelho, já o RVA identifica aumento da viscosidade da pasta de amido (TESTER; MORRISON, 1990; WANG et al., 2011).

**Tabela 6-** Propriedades térmicas dos amidos de taioba e mandioca<sup>a</sup>.

Amido	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔT	ΔH <sub>gel</sub> (J/g)
Taioba	79,3±0,07 <sup>a</sup>	82,0±0,18 <sup>a</sup>	85,2±0,05 <sup>a</sup>	5,9	17,4±0,51 <sup>a</sup>
Mandioca	63,3±0,11 <sup>b</sup>	67,8±0,01 <sup>b</sup>	72,7±0,06 <sup>b</sup>	9,4	13,7±0,24 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Valores médios obtidos de três repetições seguidos dos desvios-padrão. To: temperatura inicial; Tp: temperatura de pico; Tc: temperatura de conclusão;ΔT = faixa de temperatura (Tc – To); ΔH: variação de entalpia. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente (p<0,05).

A temperatura de pico (T<sub>p</sub>) e a temperatura de início (T<sub>o</sub>) da gelatinização pode ser usado como uma medida da estabilidade ou perfeição das regiões cristalinas e a largura do pico de endotermia como uma estimativa da heterogeneidade das estruturas cristalinas (BLENNOW et al., 2000).O amido de taioba apresentou maiores temperaturas de gelatinização (T<sub>o</sub>, T<sub>p</sub>, T<sub>c</sub>), podendo ser devido ao padrão tipo A com duplas hélices densamente empacotadas (JANE et al., 1999) e à maior ordem molecular (SRICHUWONG et al., 2005; DEMIATE et al., 2016), a forte interação das cadeias de amido e altas proporções de amilopectina de cadeias com GP 13-24, maior proporção de grânulos pequenos (ABEGUNDE et al., 2013).

A temperatura de gelatinização mais elevada que ocorre em alguns amidos com maiores proporções de cadeias ramificadas mais longas da amilopectina, é devido a formação de hélices duplas mais longas que requerem uma temperatura mais alta para dissociação (JANE et al., 1999; FRANCO et al., 2002; GANI et al., 2017). Entretanto, o amido de mandioca utilizado neste trabalho, apresentou valores mais baixos de temperatura, sugerindo que devido as maiores proporções de cadeias curtas e a presença de um ombro que ocasiona defeito na estrutura cristalina desse amido, pode contribuir para a temperatura gelatinização mais baixa (JANE et

al., 1999; CAMPANHA; FRANCO, 2011; DEMIATE et al., 2016). O amido de mandioca com padrão C<sub>A</sub>, mistura dos tipos A e B, a presença do polimorfismo tipo B contribuiria para baixa temperatura de gelatinização (JANE et al., 1999).

O valor  $\Delta H_{gel}$  dá uma medida geral de cristalinidade (qualidade e quantidade) e é um indicador da perda da ordem molecular dentro do grânulo, devido a ruptura da ligação de hidrogênio dentro do grânulo, um efeito que ocorre com a gelatinização. O amido de taioba apresentou mais alta entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ), 17,45 J/g, que pode está relacionado ao teor de amilose deste amido (GOMAND et al., 2010; DEMIATE et al., 2016), a maior cristalinidade relativa (ALVES et al., 2014), as proporções elevadas de cadeias ramificadas intermediárias da amilopectina, ocasionando um aumento na espessura das lamelas cristalinas (CAMPANHA; FRANCO, 2011) assim como maior organização e estabilidade dos cristais (ALVANI; TESTER; SNAPE, 2011; ASSAD-BUSTILHOS et al., 2014). Resultado semelhante ao encontrado por Torruco-Uco e Betancur-Ancona (2007).

O amido de mandioca apresentou maior faixa de temperatura ( $\Delta T$ ) (9,4 °C), sugerindo uma maior heterogeneidade dos cristais dentro da população do grânulo de amido de mandioca, quando comparado com a taioba (5,9 °C). Nwokocha et al. (2009), Campanha e Franco (2011) e Abegunde et al. (2013) também relataram que os amidos com menor faixa de temperatura, apresentavam cristais mais homogêneos, em decorrência do número de duplas hélices (nos domínios amorfo e cristalino) que se desagregaram e fundiram durante a gelatinização serem relativamente semelhantes.

**Tabela 7-**Propriedades de retrogradação dos amidos de taioba e mandioca<sup>a</sup>.

Amido	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta H_{ret}$ (J/g)	%R
Taioba	40,79±0,20 <sup>b</sup>	55,93±0,00 <sup>a</sup>	65,69±0,31 <sup>a</sup>	10,34±0,60 <sup>a</sup>	59,29
Mandioca	41,79±0,98 <sup>a</sup>	51,45±0,00 <sup>b</sup>	61,49±0,10 <sup>b</sup>	1,93±0,05 <sup>b</sup>	14,08

<sup>a</sup>Valores médios obtidos de três repetições seguidos dos desvios-padrão. To: temperatura inicial; Tp: temperatura de pico; Tc: temperatura de conclusão;  $\Delta T$ : faixa de temperatura;  $\Delta H_{ret}$ : entalpia de retrogradação. %R: Percentual de retrogradação [ $(\Delta H_{ret}/\Delta H_{gel}) \times 100$ ]. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente.

As temperaturas de fusão iniciais dos amidos retrogradados (Tabela 7) foram menores que as temperaturas iniciais de gelatinização dos amidos nativos, assim como o  $\Delta H_{ret}$  (J/g). Isso porque, durante o período de armazenamento dos géis de amido, ocorre a recristalização das cadeias ramificadas da amilopectina, necessitando de menor energia para a fusão dos cristais da

amilopectina, e a diminuição na entalpia de retrogradação, podendo ser devido a mais fraca cristalinidade do amido retrogradado (SANDHU; SINGH, 2007).

A porcentagem de retrogradação (% R) do amido de taioba (59,29 %) indicou alta tendência à retrogradação das moléculas de amilopectina, que foi menor para o amido de mandioca (14,08 %). Uma maior quantidade de amilose tem sido, tradicionalmente, ligada a uma maior tendência de retrogradação em amidos, mas amilopectina e materiais intermédios também desempenham um papel importante na retrogradação, ou seja, amidos que apresentam maiores proporções de cadeias curtas de amilopectina, a taxa de retrogradação é menor (JANE et al., 1999; SANDHU; SINGH, 2007; AI et al., 2011). Neste trabalho, o amido de taioba teve maior teor de amilose absoluto (Tabela 4), menor proporção de cadeias ramificadas curtas da amilopectina (Tabela 3) e maiores comprimentos médios de cadeia de ramificação de amilopectina (Figura 17), que confirma esse valor de porcentagem de retrogradação maior que o amido de mandioca.

### **5.1.9 Poder de Inchamento (PI) e Índice de Solubilidade (IS)**

Quando as moléculas de amido são aquecidos em excesso de água, a estrutura cristalina é interrompida e as moléculas de água formam ligações com os hidrogênio dos grupos hidroxila expostos de amilose e amilopectina, o que provoca um aumento da solubilidade e inchamento dos grânulos (SINGH et al., 2003).

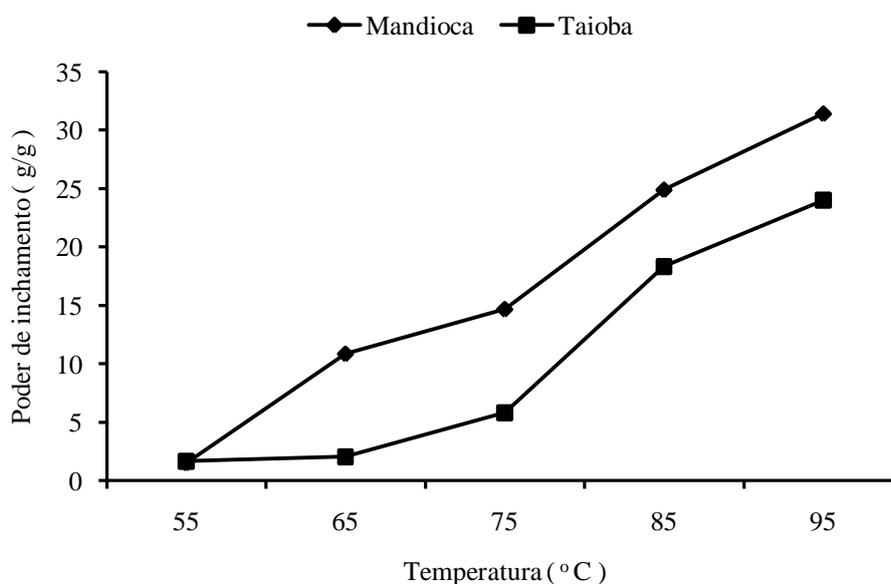
O poder de inchamento dos amidos de taioba e mandioca está apresentado na Tabela 8 e Figura 20. Observou-se que o poder de inchamento dos amidos na temperatura de 55 °C não apresentou diferenças, entretanto, os grânulos de amido começam a inchar de forma pronunciada apenas quando a temperatura atinge o início da temperatura de gelatinização, ou seja, o amido de taioba a 75 °C e o amido de mandioca a partir de 65 °C, provocando rompimento de ligações intermoleculares e a abertura das cadeias permitindo a entrada de moléculas de água (OLIVEIRA et al., 2009). O amido de mandioca apresentou um poder de dilatação cinco vezes maior quando comparado com o amido de taioba nesta temperatura (65°C), sugerindo que o amido de mandioca apresenta forças associativas internas mais fracas e uniformes no interior dos grânulos (LEACH; McCOWEN; SCHOCH, 1959; ROCHA;

DEMIATE; FRANCO, 2008). Estes resultados confirmam aqueles obtidos para as propriedades de pasta e térmicas.

**Tabela 8-** Poder de inchamento dos amidos de taioba e mandioca<sup>a</sup>.

Amido	55 °C (g/g)	65 °C (g/g)	75 °C (g/g)	85 °C (g/g)	95 °C (g/g)
Taioba	1,67±0,06 <sup>a</sup>	2,06±0,11 <sup>b</sup>	5,84±0,12 <sup>b</sup>	18,34±0,90 <sup>b</sup>	24,05±0,72 <sup>b</sup>
Mandioca	1,51±0,08 <sup>a</sup>	10,86±0,42 <sup>a</sup>	13,77±0,18 <sup>a</sup>	24,90±1,19 <sup>a</sup>	31,41±1,15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas seguidos do desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 20:** Poder de inchamento dos amidos de taioba e mandioca.

Lin et al (2016) e Zortéa-Guidolina et al (2017) reportaram que grânulos de amido de tamanhos pequenos com alto teor de amilose apresentaram menor poder de inchamento e solubilidade. Sabe-se que amilose tem a capacidade de restringir o inchaço e com isso mantém a integridade dos grânulos (TESTER; MORRISON, 1992). O amido de taioba apresentou tamanhos e distribuição de grânulos menores, maior teor de amilose absoluta, maior cristalinidade relativa assim como menor proporção de cadeias ramificadas longas de amilopectina o que pode ter favorecido para o menor poder de inchamento deste amido,

alcançando a 95 °C 24,05 g/g de poder de inchamento quando comparado com amido de mandioca (31,41g/g). Os trabalhos demonstram que amidos com maiores proporções de cadeias ramificadas longas de amilopectina contribuem para o inchamento dos grânulos de amido e empastamento, com base na explicação que o maior número de ligações de hidrogênio poderiam ser formadas entre amilopectina de cadeias ramificadas longas e a água (TESTER, MORRISON, 1990; FRANCO et al. 2001; APRIANITA et al., 2009).

Li e Zhu (2017) descreveram que as cadeias curtas poderiam aumentar o poder de inchamento, pois os defeitos na região cristalina, permitem que moléculas de água penetrem nas lamelas cristalinas. Essa afirmação reforça os resultados obtidos neste trabalho, ou seja, o amido de mandioca com maiores proporções de cadeias curtas e defeito na estrutura cristalina favoreceu o aumento do poder de inchamento. Salman et al. (2009) encontraram uma correlação entre o poder de inchamento e as cadeias curtas de amilopectina, sugerindo que essas cadeias causam efeito desestabilizador na estrutura lamelar.

Analisando o índice de solubilidade (Tabela 9; Figura 21), os amidos apresentaram aumento de solubilidade com aumento da temperatura, verificando-se que os maiores valores de solubilidade dos amidos foram obtidos a 95 °C, quando grande parte dos grânulos está gelatinizada ou intumescida. Torruco-Uco e Betancur-Ancona (2007) relataram que houve aumento na solubilidade a 90 °C em amido de mandioca (53,8 %), makal (32,8 %) e milho (15,8 %), isso porque no processo de gelatinização ocorre o inchaço dos grânulos de amido, que então rompe-se e a amilose lixivia para fora dos grânulos (SINGH; GEVEKE; YADAV, 2017).

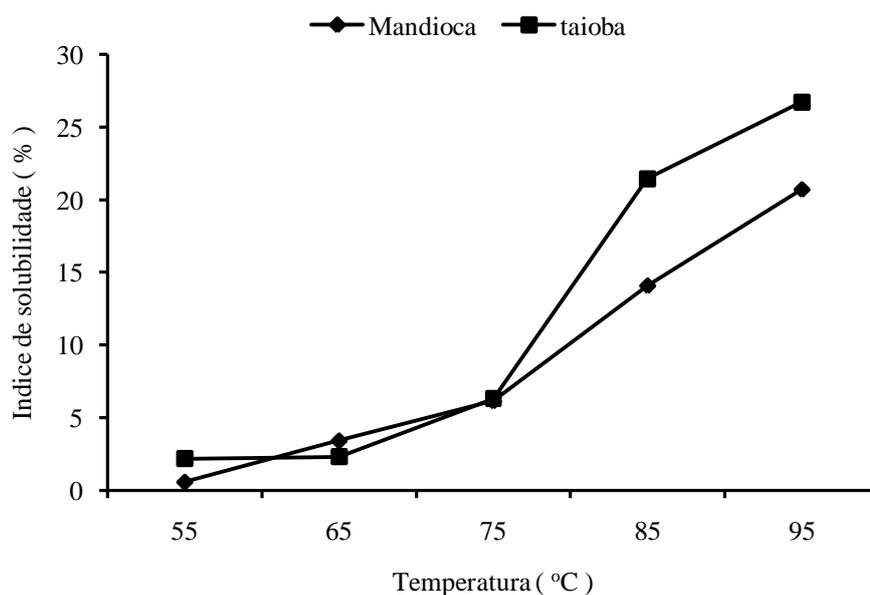
Na temperatura de 75 °C, a solubilidade dos amidos de taioba e mandioca foram semelhantes, com valores de 6,32 e 6,14 %, respectivamente. Entretanto o amido de taioba apresentou um aumento notável de aproximadamente 3,5 vezes na solubilidade, na temperatura de 85 °C, por apresentar um teor de amilose absoluto maior (Tabela 4) que a mandioca, essa amilose lixivia do grânulo ocorrendo o rompimento desses grânulos e um aumento na solubilidade, mas redução no poder de inchamento.

Deepika, Kumar e Anima (2013) e Gani et al. (2017) relataram que a diferença no índice de inchamento e solubilidade do amido tem sido atribuída à variação no conteúdo de amilose, peso molecular de moléculas de amilose e amilopectina, grupos fosfato, capacidade de retenção de água e propriedades cristalinas, evidenciando a presença de interação entre cadeias de amido dentro de domínios amorfo e cristalino.

**Tabela 9-** Índice de solubilidade dos amidos de taioba e mandioca<sup>a</sup>.

Amido	55°C (%)	65°C (%)	75°C (%)	85°C (%)	95°C (%)
Taioba	2,17±0,11 <sup>a</sup>	2,30±0,32 <sup>b</sup>	6,32±0,19 <sup>a</sup>	21,44±0,79 <sup>a</sup>	26,73±0,67 <sup>a</sup>
Mandioca	0,57±0,25 <sup>b</sup>	3,41±0,54 <sup>a</sup>	6,14±0,46 <sup>a</sup>	14,08±0,75 <sup>b</sup>	20,70±0,14 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas seguidos do desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente.



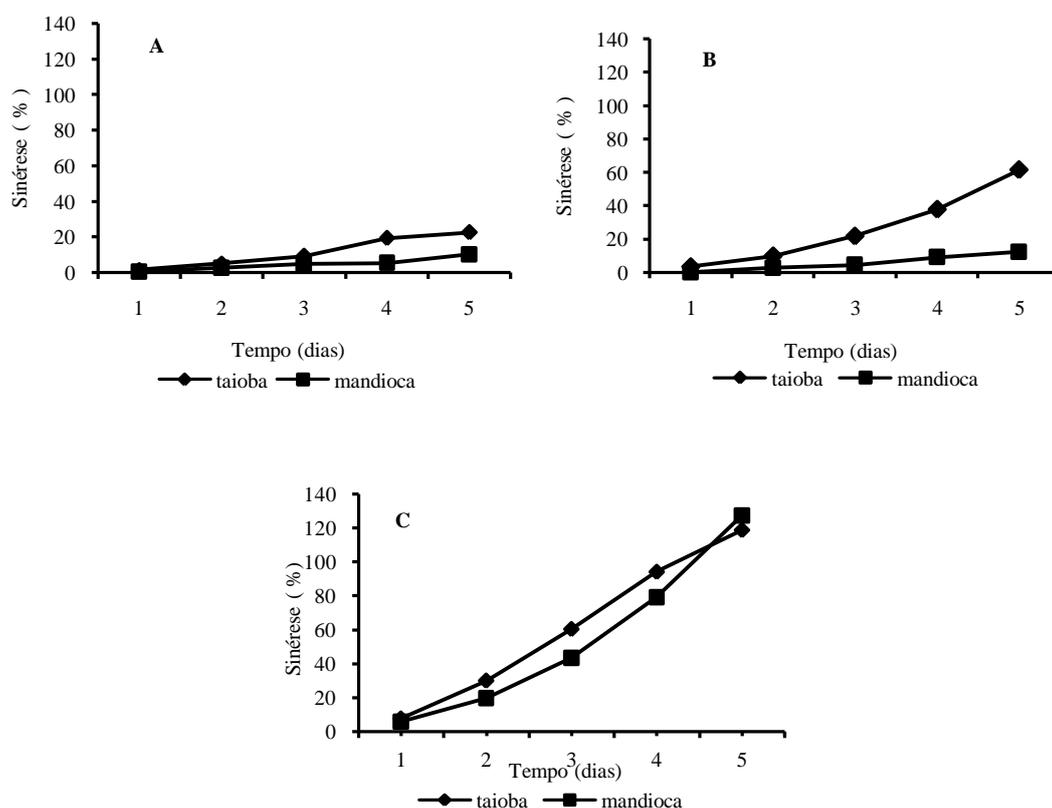
**Figura 21:** Índice de solubilidade dos amidos de taioba e mandioca.

As diferenças entre o poder de inchamento e solubilidade dos amidos de taioba e mandioca, também pode ser devido a diferenças na estrutura morfológica dos grânulos de amido, podendo explicar um maior poder de inchamento do amido de mandioca e menor solubilidade, pois apresentaram grânulos maiores e rígidos. Singh et al. (2003) descreveram que os amidos de batata por possuírem os grânulos grandes, apresentam níveis muito elevados de inchamento, sem que haja desintegração dos grânulos e com níveis inferiores de solubilidade.

### 5.1.10 Sinérese

A reorganização das moléculas de amido pode resultar na liberação de água (ou sinérese), durante o armazenamento, e isso pode afetar as propriedades funcionais em termos de viscosidade ou comportamento do gel (CHARLES et al., 2016).

A sinérese dos géis dos amidos de taioba e mandioca, estocados por cinco dias, está apresentado na Figura 22. As suspensões de amido de taioba e mandioca exibiram perda de água (sinérese) durante os cinco dias de estocagem sob temperatura ambiente, refrigeração e congelamento, entretanto a 25 °C foi a que apresentou a maior estabilidade em condições de armazenamento para as duas amostras.



**Figura 22:** Sinérese em géis de amido de taioba e mandioca em função do tempo de estocagem condicionada a 25 °C (A), 4 °C (B) e a -18 °C (C).

Na temperatura de refrigeração (4 °C), após 72 horas de armazenamento, as pastas de amido não apresentaram diferenças nas liberação de água, entretanto a partir do terceiro dia de

armazenamento, as suspensões de amido de taioba exibiram menor estabilidade, e conseqüentemente maior sinérese (21,84 %) em relação ao amido de mandioca (4,32 %). Estes valores encontrados para a sinérese concordam positivamente com os valores de *setback* de 84 e 63 obtidos no RVA para os amidos de taioba e mandioca, respectivamente e são função do maior teor de amilose absoluta do amido de taioba (Tabela 4). Também foi observado nas propriedades de retrogradação dos amidos que o amido de taioba apresentou valor muito mais alto de taxa de retrogradação das moléculas de amilopectina (Tabela 7) que o amido de mandioca, aumentando a quantidade de água expulsa do gel de amido durante o armazenamento. Singh, Kaur e McCarthy (2007) e Ascheri et al (2014) obtiveram resultados semelhantes ao observado neste trabalho, sugerindo que agregação e a cristalização da amilose ocorrem nas primeiras horas de armazenamento, com forte efeito de reordenação da amilose, enquanto a agregação e a cristalização da amilopectina ocorrem em fases posteriores.

Os resultados da liberação de água das pastas de amido quando submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento (-18 °C) pode ser observada na Figura 20. As pastas das duas amostras de amido mostraram baixa estabilidade de estocagem, com liberação de água a medida em que o número de ciclos de congelamento-descongelamento aumentou. Essa constatação pode ser observada, principalmente na suspensão de amido de taioba, que mostrou menor estabilidade, demonstrando maior sinérese (29,98 %) em relação ao amido de mandioca (19,77 %), após o segundo ciclo de congelamento-descongelamento, entretanto no quinto dia de estocagem a pasta da mandioca apresentou valor de sinérese de 127,3 %, maior que o obtido por taioba (118,7 %).

Resultados semelhantes foram obtidos Torruoco-Uco e Betancur-Ancona (2007) que relataram que o amido de makal apresentou baixa estabilidade ao ciclo de congelamento-descongelamento, e a quantidade de água separada dos géis aumentou com o tempo de armazenamento.

Por outro lado, Shirai et al (2007) citam que os amidos nativo de milho ceroso e mandioca possuem baixa tendência à sinérese e liberam pouca água quando suas pastas são submetidas ao congelamento e descongelamento.

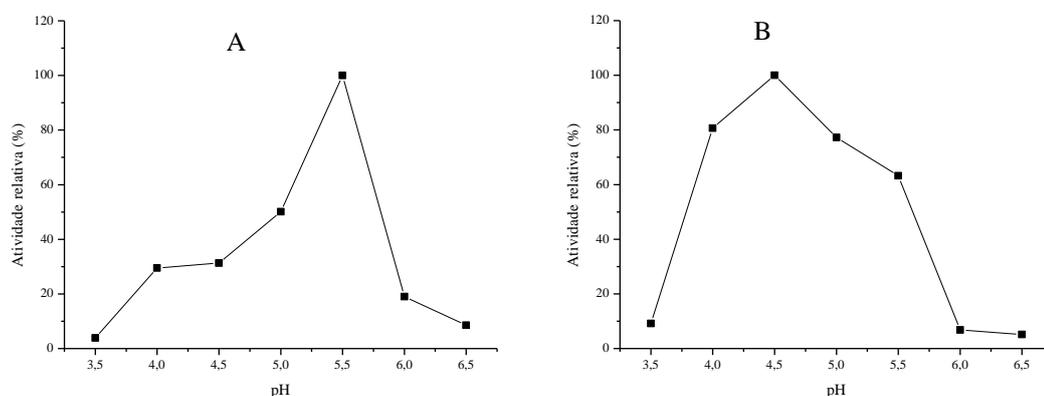
Os sucessivos ciclos de congelamento-descongelamento, afeta a estrutura do gel de amido, devido à redistribuição e diluição das pastas de amido pelo crescimento e dissolução dos cristais de gelo (VALCÁRCEL-YAMANI; RONDÁN-SANABRIA; FINARDI-FILHO, 2013).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS COMERCIAIS $\alpha$ -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE

### 5.2.1 Efeito do pH, temperatura e estabilidade térmica sobre a atividade das enzimas

A Figura 23 mostra o efeito do pH sobre a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. A  $\alpha$ -amilase apresentou pH ótimo em torno de 5,5, com redução de 80 % da atividade em pH 6,0. Resultados diferentes foram obtidos por Elkhilil e Gaffar (2011), que observaram pH ótimos de 7,0 e 6,0, para as enzimas produzidas por *Bacillus sterothermophilus* e *Bacillus acidocaldarius*, respectivamente.

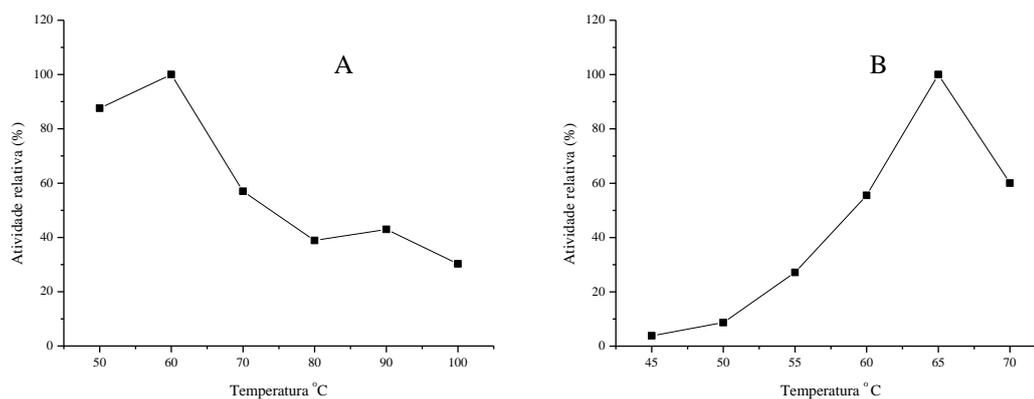
A atividade ótima da amiloglucosidase foi em pH 4,5 mantendo cerca de 80 % nos pH 4,0 e 5,0. Esse resultado corroboram com o encontrado por Bagheri, Khodarahmi e Mostafaie (2014) que afirmaram que o pH ótimo da enzima amiloglucosidase foi de 4,5. De acordo com a literatura, geralmente, amiloglucosidases obtida a partir de fungos são ativas a valores de pH ácido (DILLER et al., 2015).



**Figura 23:** Efeito da variação do pH sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase (A) e amiloglucosidase (B) a 55 °C.

Os resultados do efeito da temperatura sobre a atividade máxima das enzimas encontram-se na Figura 24. A temperatura máxima para a enzima  $\alpha$ -amilase foi a 60 °C, acima desse valor, houve uma redução na atividade da enzima, indicativo que a temperatura máxima de ativação fica muito próxima das condições de desnaturação proteica. Segundo Elkhilil e Gaffar (2011), a

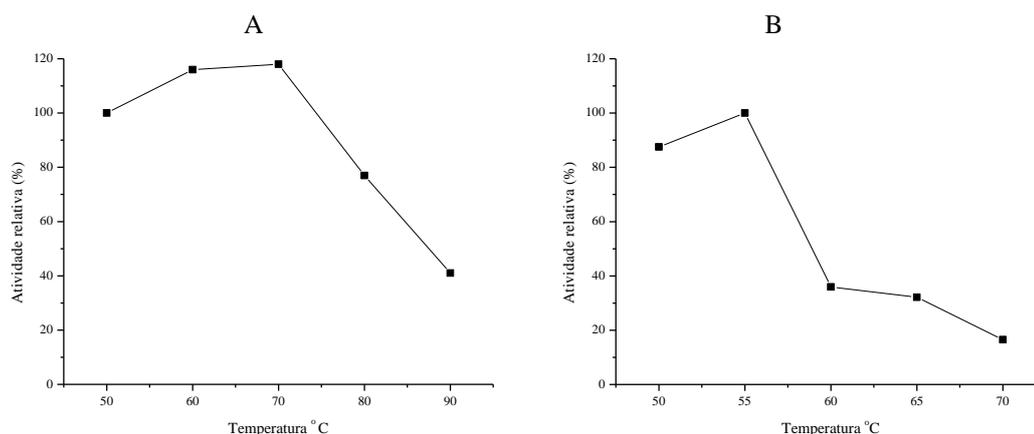
temperatura ótima da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus sterothermophilus* e *Bacillus acidocaldarius* varia entre 50 °C a 70 °C. Bozic et al. (2011) estudaram a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* e observaram temperatura ótima a 90 °C, resultado que difere do encontrado no presente estudo.



**Figura 24:** Efeito da variação da temperatura máxima sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase (A) e amiloglucosidase (B) (pH 5,0).

A atividade máxima da enzima amiloglucosidase foi observada a 65 °C. A 60 °C e 70 °C houve redução de aproximadamente 40 % da atividade inicial. Esses valores estão de acordo com o citado na literatura, com perda rápida da atividade da enzima amiloglucosidase em temperaturas elevadas (BAGHERI; KHODARAHMI; MOSTAFAIE, 2014; DILLER et al., 2015).

A estabilidade térmica está apresentada na Figura 25. A  $\alpha$ -amilase mostrou-se termoestável, com mais de 100% de atividade (6.529 U/mL) até a temperatura de 70 °C quando aquecida por 1 h na ausência do substrato. Nas temperaturas de 80 e 90 °C houve uma redução na atividade relativa, atingindo valores de 77 e 41%.



**Figura 25:** Estabilidade térmica das enzimas  $\alpha$ -amilase (A) a pH 5,5 e amiloglucosidase (B) a pH 4,5. Incubação nas temperaturas de 50 a 90 °C.

Cordeiro et al. (2002) afirmaram que  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. mantém-se estável a 50 °C por 2 h, mas nas temperaturas 60-90 °C as atividades originais foram perdidas. A amiloglucosidase apresentou estabilidade térmica em temperatura de até 55 °C, com atividade enzimática de 465 U/mL (100%) (Figura 23). Forgaty e Benson (1983), estudando amiloglucosidase de *Aspergillus niger*, citam que a enzima foi 100% estável até 50 °C e 90% estável a 60 °C durante 30 minutos, acima desta temperatura atividade enzimática foi rapidamente reduzida.

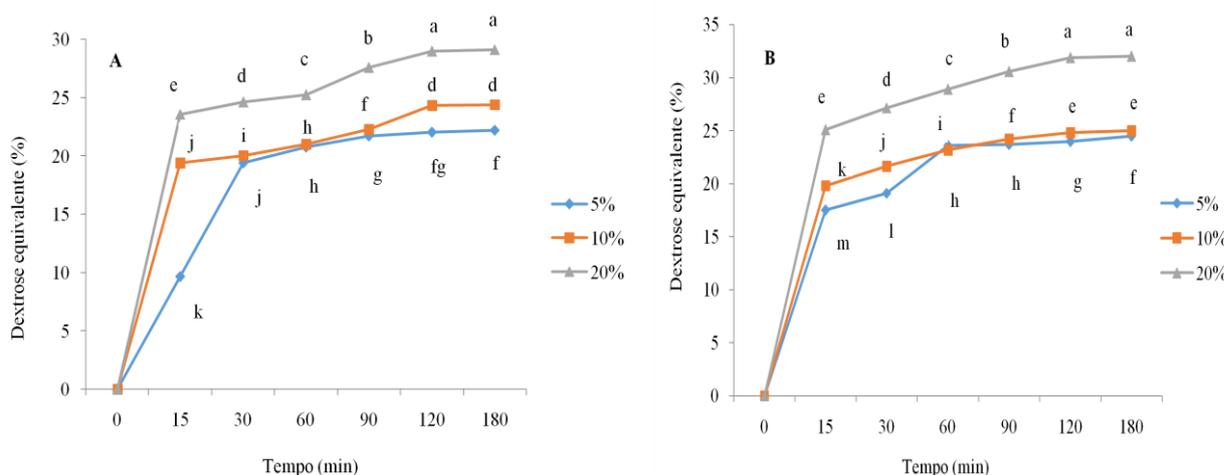
### 5.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

#### 5.3.1 Pré-teste da hidrólise do amido de mandioca

O efeito da concentração de amido de mandioca nos valores de dextrose equivalente do hidrolisado durante a liquefação, com carga enzimática de 12 U da  $\alpha$ -amilase/g de amido e 130 U da  $\alpha$ -amilase/g de amido, está apresentado na Figura 26. No geral, observa-se que com o aumento na concentração de substrato de 5 % para 20 %, houve aumento na liberação de açúcares redutores que foram quantificados por dextrose equivalente. Esta observação era esperada porque uma maior concentração de substrato indica a disponibilidade de mais amido que pode ser hidrolisado em glicose e dextrinas.

Foi verificado que o aumento na concentração de substrato favorece a produção de maior quantidade de açúcares redutores, entretanto, acima da concentração considerada ótima de substrato, ocorre redução nos valores de açúcar redutor, sugerindo que as eficiências de baixa hidrólise com maiores concentrações de substrato, provavelmente são devidas à inibição das enzimas por quantidades crescentes de produtos finais, subprodutos e/ou insuficiência de reação hidrotérmica por sobrecarga de substrato (KOSUGI et al., 2009; RUIZ et al., 2011; TAN; LEE, 2014; MOSHI et al., 2015).

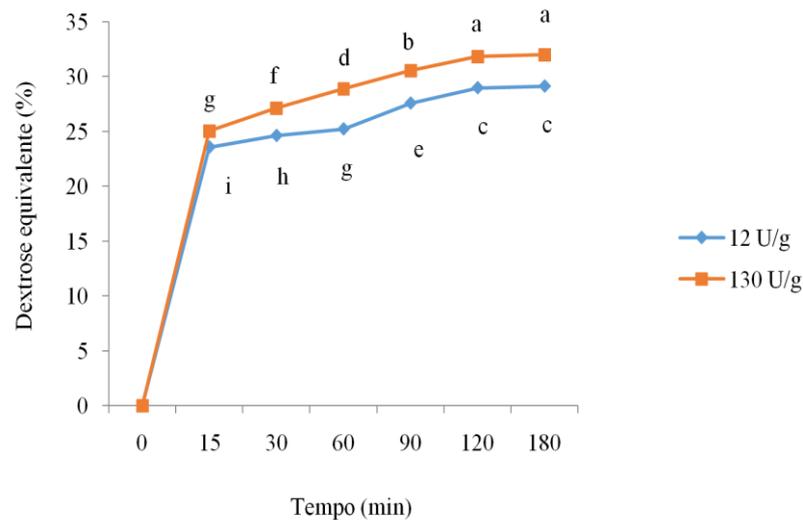
Na carga de substrato de 20 %, não houve diferença significativa nos tempos de 120 e 180 minutos de hidrólise para as duas concentrações enzimáticas, sendo que a diminuição no tempo de hidrólise significa economia de gasto energético.



**Figura 26:** Efeito da concentração de amido de mandioca nos valores de dextrose equivalente durante a liquefação com carga enzimática de 12 U/g (A) e 130 U/g (B), a 60 °C e pH de 5,5.

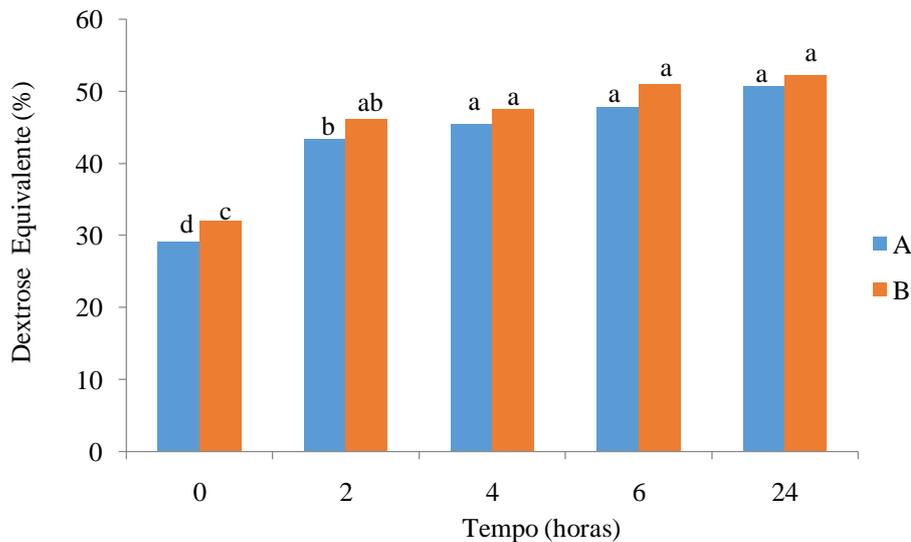
O amido de mandioca apresentou valores de dextrose equivalente em torno de 28,98-29,13 % e 31,85-32,01 com concentrações enzimáticas de 12 U/g e 130 U/g, com diferença significativa entre as concentrações enzimáticas (Figura 27). Nos resultados obtidos por Moshi et al. (2015) a farinha de mandioca apresentou o rendimento total dos açúcares redutores em torno de 25% e 55%, com uma carga enzimática de 2 e 8 U/mL, respectivamente. Contudo Ajibola, Edema e Oyewole (2012) afirmaram que a atividade da enzima aumenta com o aumento da concentração enzimática, mas quando um pico é alcançado, a adição de mais

enzima não aumenta necessariamente a atividade enzimática. Arapoglou et al. (2010) relataram que uma concentração de enzima mais elevada conduz a um maior teor de açúcar redutor fermentável, assim como, as mesmas conversões poderiam ser conseguidas com menor concentração de enzima, embora exigindo tempos mais longos.



**Figura 27:** Efeito no valor de dextrose equivalente durante a liquefação com as cargas enzimáticas de 12 U/g e 130 U/g na concentração de substrato de 20 %, a 60 °C e pH de 5,5.

Com base nos resultados de liquefação, o hidrolisado da concentração de 20 % nas duas concentrações enzimáticas foi utilizada para a etapa de sacarificação e esses resultados estão na Figura 28. O aumento no valor de dextrose equivalente foi evidenciado nas primeiras horas de reação com a enzima amiloglucosidase e os valores iniciais de dextrose equivalente é correspondente ao valor do final da hidrólise com  $\alpha$ -amilase.



**Figura 28:** Sacarificação do amido liquefeito de mandioca por  $\alpha$ -amilase na concentração de 12 U/g (A) e 130 U/g (B), a 65 °C e pH de 4,5.

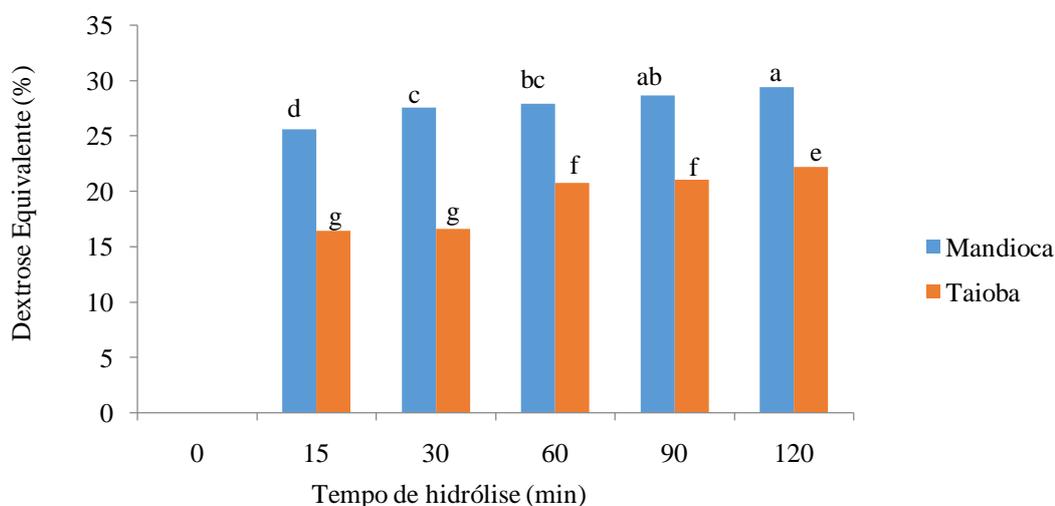
Nas primeiras 2 horas de hidrólise o valor de dextrose equivalente foi 46,15 % conseguida com a ação combinada da maior carga enzimática de  $\alpha$ -amilase (130 U/g) e a enzima amiloglicosidase. No entanto, obteve-se uma conversão bastante semelhante (DE=45,45%) quando houve a combinação da menor carga enzimática da  $\alpha$ -amilase (12 U/g) e a enzima amiloglicosidase após 4 horas de hidrólise. Observa-se que as quantidades de  $\alpha$ -amilase acima de 12 U/g não melhoraram significativamente a hidrólise do amido com amiloglicosidase, entretanto foi necessário um tempo maior de reação. Resultados semelhantes foram obtidos por Barcelos et al (2011).

### 5.3.2 Hidrólise enzimática dos amidos

Durante a liquefação, o amido é hidrolisado e produz açúcares simples como maltose, maltotriose e  $\alpha$ -dextrinas e a solução torna-se menos viscosa (LI et al., 2015).

Na Figura 29, observa-se o valor de dextrose equivalente (DE) dos amidos de taioba e mandioca na concentração de 20 %, submetidos a hidrólise com  $\alpha$ -amilase e durações de 0 a 120 minutos. O amido de mandioca obteve a melhor hidrólise em todos tempos testados quando

comparado com o amido de taioba. A liberação mínima de açúcares redutores do amido de mandioca foi no tempo de 15 minutos de reação, com valor 25,61 % de dextrose equivalente e a medida que aumentava o tempo de hidrólise ocorria liberação dos açúcares redutores. Shanavas et al. (2011) estudando a hidrólise de amido de mandioca verificaram que 30 minutos era suficiente para liberação de açúcares redutores durante a liquefação, após esse tempo de reação os valores mantinham-se constante.



**Figura 29:** Hidrólise dos amidos de taioba e mandioca na concentração dos substratos a 20 % com 12 U/g de  $\alpha$ -amilase, a 60 °C e pH de 5,5.

Nos tempos de 90 e 120 minutos, os hidrolisados de mandioca, atingiram o valores de 28,68 % e 29,45 %, de dextrose equivalente, entretanto sem diferença significativa entre si. De acordo com Montesinos e Navarro (2000), 2 h de liquefação foram absolutamente necessárias para a hidrólise completa do amido usando farinha de trigo crua como substrato. Um tempo de liquefação mais curto (0,5 ou 1 h) levou a um mosto com maior viscosidade, o que não permitiu uma hidrólise eficiente de polímeros de glicose.

O amido de taioba necessitou de um tempo maior de hidrólise, atingindo valor de dextrose equivalente de 22,18 % em 120 minutos de reação, com diferenças significativas nos tempos testados. Essas diferenças nos valores de hidrólise dos amidos de taioba e mandioca, provavelmente pode ser devido à maior viscosidade final do amido de taioba (196 RVU),

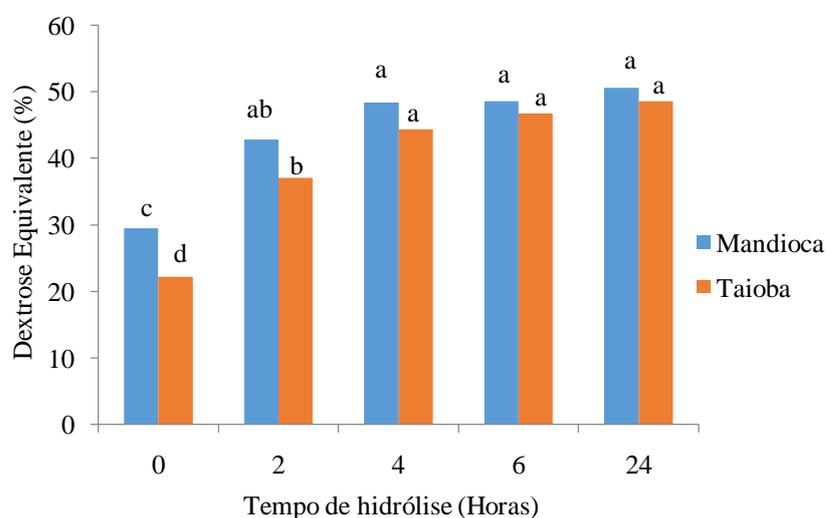
dificultando a agitação da pasta de amido e interferindo na mobilidade da enzima  $\alpha$ -amilase durante a liquefação. Montesino e Navarro (2000) descreveram que era absolutamente necessário proporcionar uma forte agitação para intensificar as interações entre o amido e a enzima durante a liquefação para proporcionar redução na viscosidade das pastas de amido.

Para as enzimas amilolíticas hidrolisarem rapidamente o amido, as moléculas de amido têm de ser transformadas em forma amorfa, ou seja, as cadeias de amilopectina ao serem derretida, causam a libertação da amilose e tornam-se facilmente acessíveis às enzimas hidrolisadoras aos grânulos, com relatos que os amidos com menores valores de dextrose equivalente durante a liquefação correspondem àquelas com gelatinização incompleta do amido por tratamento térmico e tiveram menor mobilidade das moléculas de água (WU et al., 2006; LI et al., 2015; APPIAH-NKANSAHA et al., 2016). Entretanto, os amidos estudados foram previamente gelatinizados, antes da hidrólise, visto que a temperatura ótima da enzima  $\alpha$ -amilase era de 60 °C e as temperaturas de transição dos amidos de taioba (79,3 e 85,2 °C) e de mandioca (63,3 e 72,7 °C) estão acima da temperatura ótima.

Srichuwong et al. (2012), estudando a hidrólise dos amidos de duas cultivares de batata-doce, verificaram aumento acentuado nos valores de dextrose equivalente quando a temperatura de liquefação está dentro do intervalo da temperatura de gelatinização dos amidos. Também foi demonstrado que, para as duas cultivares, os valores de DE diminuíram ligeiramente quando as massas foram liquefeitas à temperatura elevada (100 °C). Isto poderia ser devido a uma atividade hidrolítica reduzida da  $\alpha$ -amilase bacteriana à temperatura muito alta.

A enzima  $\alpha$ -amilase atua nas porções interiores dos dois principais polímeros do amido, amilose (ligações  $\alpha$ -1,4) e amilopectina (ligações  $\alpha$ -1,6), para formar cadeias de glicose de comprimento variável (DUVERNAY et al., 2013). Os amidos de raízes e de tubérculos podem conter cadeias de amilopectina mais longas e mais complexas, tornando-se mais difícil hidrolisar em açúcares fermentáveis (HOOVER, 2001; SRICHUWONG et al., 2005). Por outro lado, aos amidos que apresentaram maiores taxas de hidrólise, pode ser atribuído às maiores proporções de cadeias ramificadas curtas (GP 6-12) de suas amilopectinas (AI et al., 2011; SRICHUWONG et al., 2012), sugerindo que o amido de mandioca, por apresentar uma maior proporção de cadeias curtas, apresentou maior susceptibilidade enzimática, com maior liberação de açúcares redutores e conseqüentemente maiores valores de dextrose equivalente.

A enzima amiloglucosidase permite a hidrólise total de dextrina em glicose fermentável, para todos os tipos de amido (NGUYEN; LE; CHU-KY, 2014). Na etapa de sacarificação com enzima amiloglucosidase (Figura 30), o aumento nos valores de dextrose equivalente foram evidenciados nas primeiras 2 horas de reação para ambos hidrolisados. No hidrolisado de mandioca, entre os tempos de 2 e 4 horas de reação, com produção de 42,8 % e 48,5 % de dextrose equivalente, sendo estatisticamente iguais pelo teste *t* ao nível de probabilidade de 5 %. Ajibola, Edema e Oyewole (2012) ao avaliarem a hidrólise enzimática de duas variedades de mandioca obtiveram valores mais elevado de açúcares redutores em 48 horas de reação.



**Figura 30:** Efeito do tempo de hidrólise na sacarificação dos amidos de taioba e mandioca, a 65°C e pH de 4,5.

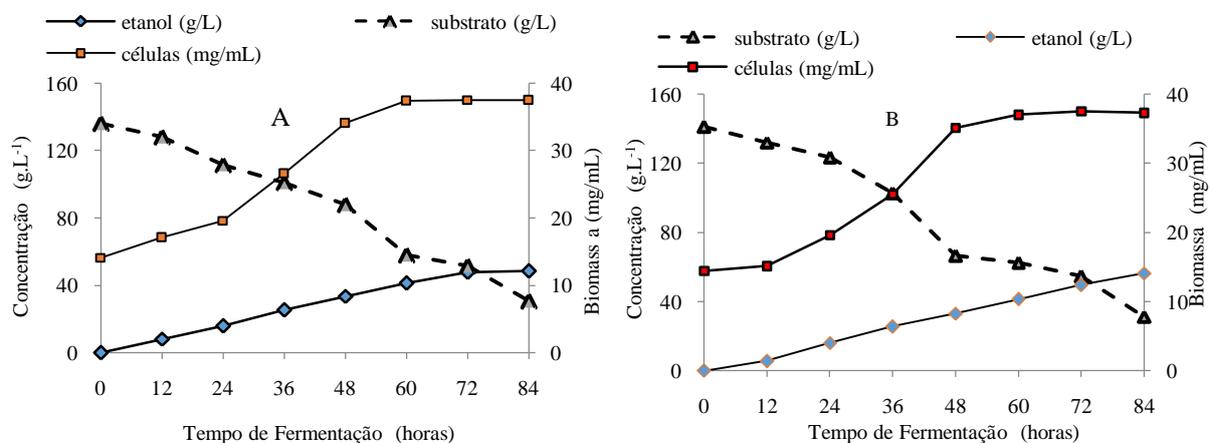
Por outro lado, o hidrolisado de taioba atingiu o valor de dextrose equivalente de 37,06 % em 2 horas e 44,37 % em 4 horas, necessitando de maior tempo para produção de açúcares fermentáveis. Após às 4 horas de hidrólise, não houve diferença nos valores de dextrose equivalente, nos tempos testados para o hidrolisado de taioba. Pode-se notar que a taioba necessitou de um tempo maior de hidrólise, com gasto de energia maior que a mandioca mas com valores de dextrose equivalente semelhantes para ambos hidrolisados, sem diferença estatística a partir de 4 horas de de reação.

Johnson, Padmaja e Moorthy (2009) verificaram que os valores dos açúcares redutores foi maior na mandioca que na batata-doce, entretanto, com tempo de reação para duas amostras iguais, considerando o processo total um gasto elevado em energia.

### 5.3.3 Fermentação dos hidrolisados

A fermentação foi realizada em 84 horas utilizando os meios hidrolisados da taioba e mandioca e os resultados estão apresentados nas Figura 31.

A levedura JP1 cresceu até 60 horas de fermentação, para ambos hidrolisados, com produção de etanol 41,6 g.L<sup>-1</sup> (taioba) e 41,2 g.L<sup>-1</sup> (mandioca), demonstrando que o aumento na concentração celular aumenta a produção de bioetanol, se estabilizando a partir deste tempo, sendo que essa inibição do crescimento pode ser devido a concentração de álcool (5%) no fermentado.



**Figura 31:** Curva de produção de etanol durante 84 horas de fermentação a partir dos hidrolisados de taioba (A) e mandioca (B).

De acordo com Tan e Lee (2014), o aumento no tamanho do inóculo causará um aumento na produção de bioetanol, entretanto, após atingir o nível ótimo de inóculo, a alta concentração de inóculo pode afetar adversamente a produção de bioetanol, reduzindo a viabilidade da população de leveduras.

Não foi detectado declínio no crescimento da levedura, em ambos hidrolisados, mantendo-se constante até o final da fermentação, com consumo de açúcares e produção de etanol. Sugere-se, a partir desses resultados, que o crescimento das leveduras cessou, mas o metabolismo continuou. Desta forma, o etanol foi formado durante o crescimento e durante a fase estacionária, embora seja um metabolito primário (DEVANTIER; PEDERSEN; OLSSON, 2005).

Os dados da fermentação alcoólica dos hidrolisados de mandioca e taioba pela levedura JP-1 estão apresentados na Tabela 10. A concentração inicial de açúcares dos hidrolisados de mandioca foi de 143,04 g.L<sup>-1</sup> e 136,47 g.L<sup>-1</sup> para taioba e a produção máxima de etanol, após 84 horas de fermentação foram de 56,34 e 48,38 g.L<sup>-1</sup>, com produtividade de 0,67 e 0,56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e rendimentos na faixa de 0,49 e 0,46 para os hidrolisados de mandioca e taioba, respectivamente.

**Tabela 10:** Dados da fermentação alcoólica dos hidrolisados de mandioca e taioba pela levedura industrial JP-1.

Indicadores	Fermentação alcoólica	
	Mandioca	Taioba
Produção máxima de etanol (g.L <sup>-1</sup> )	56,34	48,38
Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,67	0,56
Rendimento (Y <sub>P/S</sub> )	0,49	0,46
Eficiência (%)	96,03	89,57

Barcelos et al. (2011) avaliaram a produção de etanol a partir de grãos de sorgo com estirpe industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (JP1), a concentração máxima de etanol produzida foi de aproximadamente 106 g.L<sup>-1</sup> (concentração de glicose inicial de 250 g.L<sup>-1</sup>), resultando numa produtividade volumétrica de 4,4 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e um rendimento de 0,499.

Os açúcares consumidos foram 105,7 g.L<sup>-1</sup> (taioba) e 109,84 g.L<sup>-1</sup> (mandioca), ou seja, aproximadamente 77% dos açúcares presente no meio foram consumido, indicativo da eficiência da bioconversão da levedura (Figura 31). Houve semelhança no consumo dos açúcares entre as amostras mas o maior rendimento (0,49) e eficiência de conversão de açúcar em etanol (96,03 %) foi obtido pelo hidrolisado de mandioca quando comparado a taioba. Geralmente, a eficiência de conversão para produzir etanol por fermentação fica em torno de 90-95%, e as razões para a eficiência de conversão imperfeita podem incluir hidrolisações

incompletas de amidos, consumo de glicose (devido ao crescimento da levedura durante a fermentação) ou a produção inevitável de subprodutos durante a fermentação do etanol (INLOW; MCRAE; BEN-BASSAT, 1988; WU et al., 2006).

Nos trabalhos de Barcelos et al (2011) e Reis et al. (2012) eficiência de conversão da levedura *S. cerevisiae* JP1 foi de 99,3% e 93 %, semelhante ao obtido neste trabalho pelo amido de mandioca. Izmirlioglu e Demirci (2016) relataram que o pH e a agitação influenciaram a produção de etanol em resíduos de batata por *S. cerevisiae*, atingindo valores de 37,05 g.L<sup>-1</sup> de etanol com 92,08% de rendimento teórico e 2,31 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de produtividade.

## 6. CONCLUSÃO

- Composição química dos amidos mostraram pureza satisfatória para caracterização.
- Amido de taioba apresentou temperaturas de gelatinização mais elevadas, maiores alterações de entalpia de gelatinização e maiores percentagens de retrogradação, mas com valores de hidrólise menores que o amido de mandioca.
- Essas diferenças podem ser atribuídas à menor proporção de cadeias ramificadas curtas (GP 6-12) da amilopectina e a maior viscosidade final do amido de taioba.
- O amido de taioba apresentou maior resistência a altas temperaturas e baixa estabilidade durante a refrigeração, o que habilita este amido para usos em diversos produtos e formulações que requeiram temperaturas elevadas, mas que não necessitem ser passar por ciclos de congelamento-descongelamento.
- A eficiência da fermentação alcoólica do hidrolisado de taioba foi de 89,57 %, e rendimentos de 0,46, o que demonstrou o potencial de utilização deste amido na produção do bioetanol.

## 7.REFERÊNCIAS

AACC - Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 7 ed., 2 v., St, Paul, Minnesota, 2000.

ABEGUNDE, O. K.; MU, T. H.; CHEN, J. W.; DENG, F. M. Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry. **Food Hydrocolloids**, 33, 169–177, 2013.

AI ,Y.; MEDIC, J.; JIANG, H.; WANG, D.; JANE, J. Starch Characterization and Ethanol Production of Sorghum. **Journal Agricultural Food Chemistry**. n. 59, p.7385–7392, 2011.

AIYER, P.V. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n.13, p.1525-1529, 2005.

AJIBOLA, F.O.; EDEMA, M.O.; OYEWOLE, O.B. Enzymatic Production of Ethanol from Cassava Starch Using Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae*.**Nigerian Food Journal**, v. 30, n.2, 2012.

AKPAN, E.J.; UMOH, I.B. Effect of heat and tetracycline treatments on the food quality and acidity factors in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.)Schott).**Pakistan Journal of Nutrition**, n.3, v.4, p. 240-243, 2004.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ALVANI, K.; QI, X.; TESTER, R. F.; SNAPE, C. E. Physico-chemical properties of potato starches. **Food Chemistry**, v.125, n.3, 958–965. 2011.

ALVES, F.V.; POLES, L.F.; AGUIAR, C.L.; SARMENTO, S.B.S. Structural and physicochemical characteristics of starch from sugarcane and sweet sorghum stalks. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p.592–597, 2014.

APPIAH-NKANSAHA, N.B.; ZHANG, K.; ROONEY, W.; WANG, D. Model study on extraction of fermentable sugars and nonstructural carbohydrate from sweet sorghum using diffusion process. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p.654–662, 2016.

APRIANITA, A.; PURWANDARI, U.; WATSON, B.; VASILJEVIC, T. Physico-chemical properties of flours and starches from selected commercial tubers available in Australia. **International Food Research Journal**, v.16, p.507-520.2009.

ARAPOGLOU, D.; VARZAKAS, T.; VLYSSIDES, A.; ISRAILIDES, C. Ethanol production from potato peel waste (PPW). **Waste Management**, v. 30, p.1898–1902, 2010.

ASCHERI, D.P.R.; MORAIS, C.C.; ASQUIERI, E.R.; CARVALHO, C.W.P.; ASCHERI, J.L.R. Characterization of starch extracted from the roots of *Cissus siliquosa* Roem. & Schult. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 787-800, 2014.

ASSAD-BUSTILHOS, M.; RAMÍREZ-GILLY, M.; TECANTE, A.; CHAIRES-MARTÍNEZ, L. Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*). **Agrociencia**, v. 48, p.789-803, 2014.

ATWEEL, W. A. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. **Cereal foods World**, v. 33, p. 306–311, 1988.

BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry**, v.161, p. 270-278, 2014.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p.89–105, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. v.52, p.858–875, 2011.

BAFRNCOVA, P.; SMOGROVICOVA, D.; IVETA SLAVIKOVA, I.; PATKOVA, J.; DÖMENY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.337–341, 1999.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V; PEREIRA JR, N. Ethanol production from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]: Evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hydrolysate fermentability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 04, p. 597 - 604, 2011.

BARUQUE FILHO, E.A.; BARUQUE, M.G.A; SANT`ANNA JR., G.L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale approach to improve conversion yield. **Bioresource Technology**, v.75, p.49-55, 2000.

BLENNOW, A.; BAY-SMIDT, A. M.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.211–218, 2000.

BOZIC, N.; RUIZ, J.; LOPÉZ-SANTÍN, J.; VUJCIC, Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amilase from a *Bacillus licheniformis* ATTC 9945a. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, p. 203-209.2011.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granule: structure and biosynthesis – Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85–112, 1998.

CAMILI, E.C.; AZEVEDO, C.C.B.V.; BOCUTI, E.D.; SILVÉRIO, J.M.; BARROS, K.C.; SILVA, A.R.B.; JÚNIOR, S.S. Cultivo consorciado de alface sob diferentes arranjos espaciais e manejo do dossel de taioba. **Revista Agrarian**, v.6, n.20, p.110-120, 2013.

CAMPANHA, R. B. Características físico-químicas e estruturais de amidos nativos e suas dextrinas Naegeli. 79f. (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

CAMPANHA, R. B.; FRANCO, C. L. M. Gelatinization properties of native starches and their Naegeli dextrans. **Journal Thermal Analyses Calorimeter**, DOI 10.1007/s10973-011-1682-7, 2011.

CERQUEIRA, V. C. **Produção de frutose a partir de hidrolisado enzimático de amido de mandioca**. 76f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2012.

CHARLES, A.L.; CATO, K.; HUANG, T; CHANG, Y.; CIOU, J.; CHANG, J.; LIN, H. Functional properties of arrowroot starch in cassava and sweet potato composite starches. **Food Hydrocolloids**, v.53, p.187-191, 2016.

CIACCO, C.F.; CRUZ, R. **Tecnologia Agroindustrial**: Fabricação de amido e sua utilização. São Paulo: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1987. v.7. 152p.

CINELLI, B.A.; LÓPEZ, J.A.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G.; CASTRO, A.M. Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: a bioprocess within the context of biorefinery. **Fuel**, v.124, p. 41–48, 2014.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527–1534, 2009.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of  $\alpha$ -amilase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57-61, 2002.

DAIUTO, R.E.; CEREDA, M.P. Características físicas e avaliação energética de géis de fécula de tuberosas submetidos ao estresse de esterilização. **Energia na Agricultura- Botucatu**, v.21, n. 2, p.45-60, 2006.

DEEPIKA,V.; KUMAR, K.J.; ANIMA, P. Isolation and partial characterization of delayed releasing starches of *Colocasia* species from Jharkhand, India. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p.253– 258, 2013.

DEMIATE , I. M. ; FIGUEROA, A.M.;ZORTÉA-GUIDOLIN, M.E.B.; SANTOS, T.P.R.; YANG-CHENG, H; CHANG, F.; JANE, J. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil, *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 812-820, 2016.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.68, p.622-629, 2005.

DILLER, G.; CHEVALLIER, S.; POHLMANN, I.; GUYON, C.; GUILLOUX, M.; LE BAIL, A. Assessment of amyloglucosidase activity during production and storage of laminated pie dough. Impact on raw dough properties and sweetness after baking. **Journal of Cereal Science**, v. 61, p. 63-70, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUVERNAYA, W.H.; CHINNA, M.S.; CRAIG YENCHOB, G. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. *Industrial Crops and Products*. v. 42, p.527– 537, 2013.

ELIASSON, A.C.; RYANG, H.K. Changes in rheological properties of hydroxipropyl potato starch paste during freeze–thaw treatments. *Journal of Texture Studies*, v.23, p.279-296, 1992.

ELKHALIL, E. A. I.; GAFFAR F. Y. Biochemical characterization of thermophilic amylase enzyme isolated from *Bacillus* strains. *International Journal of Science and Nature*, v. 2, n. 3, p. 616-620, 2011.

EPE, 2016. Empresa de Pesquisa Energética. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2015. Disponível em: [www.epe.gov.br](http://www.epe.gov.br)

FALADE, K.O.; OKAFOR, C.A. Physicochemical properties of five cocoyam (*Colocasia esculenta* and *Xanthosoma sagittifolium*) starches. *Food Hydrocolloids*, v. 30, p.173-181, 2013.

FERRINI, L.M.K. **Efeito da modificação ácido-metanólica nas características estruturais e físico-químicas de amidos de milho e mandioca**. 93f. (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

FOGARTY, W. M.; BENSON, C. P. Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v.18, n.5, p. 271-278, 1983.

FRANCO, C.M.L.; WONG, K.; YOO, S.; JANE, J. Structural and Functional Characteristics of Selected Soft Wheat Starches. *Cereal Chemistry*, v. 79, n. 2, p. 243–248, 2002.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Culturas de Tuberosas**

**Amiláceas Latino Americanas: Propriedades Gerais do Amido.** v. 1 Campinas: Fundação Cargill, 2001. 224p.

FRANCO, C. M. L.; OGAWA, C.; RABACHINI, T.; ROCHA, T. S.; CEREDA, M. P. Effect of Lactic Acid and UV Irradiation on the Cassava and Corn Starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v.53, p.443-454, 2010.

GALLANT, D.J. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, Weinheim, v.34, n.8, p.255-262, 1982.

GANI, A.; ASHWAR, B.A.; AKHTER,G.; SHAH, A.; WANI, I.A.; MASOODI, F.A. Physico-chemical, structural, pasting and thermal properties of starches of fourteen Himalayan rice cultivars. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.1101–1107, 2017.

GARCIA, A.C.A.B.; LEONEL, M. Efeito da concentração de ácido láctico sobre a propriedade de expansão em amidos modificados fotoquimicamente. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 629-634, 2005.

GENKINA, N. K.; WIKMAN, J.; BERTOFT, E.; YURYEV, P. Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2329–2335, 2007.

GOMAND, S. V.; LAMBERTS, L.; DERDE, L. J.; GOESAERT, H.; VANDEPUTTE, G. E.; GODERIS, B.; VISSER, G.F.; DELCOUR, J.A.. Structural properties and gelatinisation characteristics of potato and cassava starches and mutants thereof. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.307–317, 2010.

GOMES, G.B.; RODARTE, M.F.; CAMPOS, R.F.B.; SANTOS, F.S. Caracterização do consumo da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) pela população da região pericentral do município de São Roque, SP. **Revista Eletrônica acadêmica IFSP – Campus São Roque**, v.1, n. 3, p.76-81, 2014.

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

HASHEM, M.; DARWISH, S. M. I.. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioenergy**, v.34, p. 953–959, 2010.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253–267, 2001.

HOYOS-LEYVA, J.D; BELLO-PEREZ, L.A; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Structural characterization of aroid starches by means of chromatographic techniques. **Food Hydrocolloids**, v.69, p.97-102, 2017.

HUANG, J.; SHANG, Z.; MAN, J.; LIU, Q.; ZHU, C.; WEI, C. Comparison of molecular structures and functional properties of high-amylose starches from rice transgenic line and commercial maize. **Food Hydrocolloids**, v.46, p.172–179, 2015.

INLOW, D.; MCRAE, J.; BEN-BASSAT, A. Fermentation of Corn Starch to Ethanol with Genetically Engineered Yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 227-234, 1988.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Ethanol production in biofilm reactors from potato waste hydrolysate and optimization of growth parameters for *Saccharomyces cerevisiae*. **Fuel**, v. 181, p.643-651, 2016.

JACOBS, H.; EERLINGEN, RC; ROUSEU, N; COLONNA, P; DELCOUR, J. A. Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydr Res.* 1998 (308), p. 359-371.

JAGATEE, S.; BEHERA, S.; DASH, P.K.; SAHOO, S.; MOHANTY, R. C. Bioprospecting Starchy Feedstocks for Bioethanol Production: A Future Perspective. **Journal of Microbiology Research and Reviews**, v.3, n.3, p. 24-42, 2015.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205–213, 2006.

JANE, J.; CHEN, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 60–65, 1992.

JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effect of amylopectin branch length and amylase content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n.5, p. 665-680, 1999.

JOHNSON, R.; PADMAJA,G.; MOORTHY, S.N. Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.10, p.616–620, 2009.

JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**, v. 16, n. 10, p. 334–340, 1971.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J., Location of amylose in normal starch granules. II. Locations of phosphodiesterase cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 282–287, 1996.

KASEMSUWAN, T.; JANE J.; SCHNABLE, P.; STINARD, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (ae1-5180) maize starch. **American Association of Cereal Chemists**.v.72, p.457-464, 1995.

KOSUGI, A.; KONDO, A.; UEDA, M.; MURATA, Y.; VAITHANOMSAT, P.; THANAPASE, W.; ARAI, T.; MORI, Y. Production of ethanol from cassava pulp via

fermentation with a surface engineered yeast strain displaying glucoamylase. **Renewable Energy**, v.34, p.1354-1358, 2009.

LADEIRA, T.; SOUZA, H.; PENA, R. Characterization of the roots and starches of three cassava cultivars. **International Journal of Agricultural Science Research**. v.2, n.1, p.012-020, 2013.

LAWAL, O.S. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidised, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. **Food Chemistry**, n. 87, p.205–218. 2004.

LAWAL, O.S. Studies on the hydrothermal modifications of new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p.268–277, 2005.

LEACH, H.W. Y; McCOWEN, L.D.; SCHOCH, T.J. Structure of starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v.36, n.6, p.534-544, 1959.

LEE, W.S.; CHEN, I.C.; CHANG, C.H.; YANG, S.S. Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v.39, n.1, p.216-222, 2012.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p.579-588, 2007.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 65-69, 2002.

LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 3-14, 2000.

LIN, L.; CAI, C.; GILBERT, R.G. ; LI, E.; WANG, J.; WEI, C. Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. **Food Hydrocolloids**, v.52, p. 359-368, 2016.

LI, G.; ZHU, F. Amylopectin molecular structure in relation to physicochemical properties of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 396–402, 2017.

LI, Z.; LIU, W.; GU, Z.; LI, C.; HONG, Y.; CHENG, L. The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. **Food Hydrocolloids**, v.48, p.189-196, 2015.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LIMA, A. S. G.; KRUPK, R. A. Caracterização morfológica, anatômica, e toxinas endógenas em *Co-locasia esculenta* (L.) Schott e *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. **Luminária**, União da Vitória, v.18, n. 1, p. 31-40, 2016.

LONDOÑO-RESTREPO, S. M.; RINCÓN-LONDOÑO, N.; CONTRERAS-PADILLA, M.; ACOSTA-OSORIO; A. A., BELLO-PÉREZ; L. A., LUCAS-AGUIRRE; J. C.; QUINTERO, V. D. Physicochemical, morphological, and rheological characterization of *Xanthosoma robustum* Lego-like starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 65, 222–228, 2014.

MA, M.; WANG, Y.; WANG, M.; JANE, J.; DU, S. Physicochemical properties and in vitro digestibility of legume starches. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p.249-255. 2017.

MANGAN, F.X.; MENDONÇA, R.U.; NUNES, S.V.; FINGER, F.L.; BARROS, Z.J.; GALVÃO, H; ALMEIDA, G.C.; SILVA, R.A.N.; ANDERSON, M.D. Production and marketing of vegetables for the ethnic markets in the United States. **Horticultura Brasileira**, v.26, n. 1, p.06-14, 2008.

MENDES, M.L.M.; BORA, P.S.; RIBEIRO, A.P.L. Propriedades morfológicas e funcionais e outras características da pasta do amido nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga (*Mangifera indica* L.), variedade Tommy Atkins. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.76-84, 2012.

MENDES, T.D.C.; SANTOS, J.S.; VIEIRA, L.M.; CARDOSO, D.S.C.P.; FINGER, F.L. Influência do dano físico na fisiologia pós-colheita de folhas de taioba. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p.682-687, 2011.

MISHRA, S.; RAI, T. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.557–566, 2006.

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

MOORTHY, S.N. Physicochemical and Functional Properties of Tropical Tuber Starches: A Review. **Starch/Stärke**, v. 54, p.559–592, 2002.

MONTESINOS, T.; NAVARRO, J. Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p.362–370, 2000.

MORAES, J.; ÁLVES, F. S.; FRANCO, C. M. L. Effect of ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava and Peruvian carrot starches. **Starch–Stärke**, v. 65, p. 200–209, 2013.

MORAIS, V.S.; MARTINS, J.A.; WEBER, M.B.; SENA, D.R. Efeito do tipo de cultivo no conteúdo de vitamina C em folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, n.1, v.2, p.64-68, 2006.

MOSHI, A.P.; HOSEA, K.M.M.; ELISANTE, E.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. High temperature simultaneous saccharification and fermentation of starch from inedible wild cassava

(*Manihot glaziovii*) to bioethanol using *Caloramator boliviensis*. **Bioresource Technology**, v. 180, p.128–136. 2015.

MORALES, R.; LÓPEZ, F.R. The political economy of bioenergy in the United States: A historical perspective based on scenarios of conflict and convergence. **Energy Research & Social Science**, v.27, p. 141–150, 2017.

MORRISON, W.R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. **Cereal Food World**,v.40, n.6, p.437-446, 1995.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturation state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Stärke**. v. 35, p.407-410, 1983.

NGUYEN,C.; LE, T.; CHU-KY, S. Pilot scale simultaneous saccharification and fermentation at veryhigh gravity of cassava flour for ethanol production. **Industrial Crops and Products**. v. 56, p.160–165, 2014.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓA, J. M.; CLAEYSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKEA, I. Purification and characterisation of amyolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 345-352, 2002.

NISHANTHINI, A.; MOHAN, V.R. Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various in vitro assay models. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.1701-1706, 2012.

NUWAMANYA, E.; BAGUMA, Y.; EMMAMBUX, N.; RUBAIHAYO, P. Crystalline and pasting properties of cassava starch are influenced by its molecular properties. **African Journal of Food Science**, v.4, n.1, p. 008-015, 2010.

NWOKOCHA, L. M.; AVIARA, N. A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.362–367, 2009.

OLIVEIRA, F.J.C.; BRAZ, L.CC.; GUIMARÃES, J.C.; ALMEIDA, R.S.; PEQUENO, O.T.B.L.; CAMPOS, I.C.P.; QUEIROZ, J.C.F. Análise do processo fermentativo de uva da variedade isabel por *Saccharomyces cerevisiae* JP1 para produção de vinho. **Revista Saúde e Ciência**, v.3, n.3, p.240-252, 2014.

OLIVEIRA, T.M.; PIROZI, M.R.; BORGES, J.T.S.; GERMANI, R.; FONTES, M.P.F. Caracterização do amido de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). **Boletim Ceppa**, v. 27, n. 1, p. 27-42, 2009.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 1–17, 2001.

PEPE, L. S.; MORAES, J.; ALBANO, K.M.; TELIS, V.R.N.; FRANCO, C.M.L. Effect of heat moisture treatment on the structural, physicochemical, and rheological characteristics of arrowroot starch. **Food Science and Technology International**, v.22, n.3, p. 256–265. 2015.

PERERA, C.; HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, n. 64, p. 361-375, 1999.

PÉREZ, E.; SCHULTZ, F.S.; DELAHAYE, E.P. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro). **Carbohydrate Polymers**, v.60, p.139–145, 2005.

PÉREZ, E.E.; BREENE, W.M.; BAHNASSEY, Y.A. Gelatinization profiles of peruvian carrot, cocoyam and potato starches as measured with the brabender viscoamylograph, rapid-visco analyzer, and differential scanning calorimeter. **Starch/Stärke**, v.50, n. 1, p. 14–16. 1998.

PEREZ-REA, D.; ROJAS, C.; CARBALLO, S.; AGUILAR, W.; BERGENSTAHL, B.; NILSSON, L. Enzymatic hydrolysis of *Canna indica*, *Manihot esculenta* and *Xanthosoma sagittifolium* native starches below the gelatinization temperature. **Starch/Stärke**, v. 65, p.151–161, 2013.

PÉREZ, S.; BALDWIN, P.M.; GALLANT, D.J. Structural features of starch granules I. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. (Ed.). **Starch: Chemistry and Technology**. USA: Elsevier's Science & Technology Rights, 2009. p. 152.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science Technology International**, v. 12, n. 5, p. 505–513, 2006.

PIETRZAK, W.; KAWA-RYGIELSKA J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat–rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. **Fuel**, v. 147, p.236–242, 2015.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Glucose syrup production from Indonesian palm and cassava starch. **Food Research International**, v. 28, n. 4, p. 379-385, 1995.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K. R. S. S. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p. 645-648, 2003.

REIS, V.C.B; NICOLA, A.M; OLIVEIRA NETO, O.S; BATISTA, V.D.F; DE MORAES, L.M.P; TORRES, F.A.G. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.39, n. 11, p.1673-1683, 2012.

ROCHA, T.S.; DEMIATE, I.M.; FRANCO, C.M.L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p. 620-628, 2008.

ROLLAND-SABATÉ, A.; SÁNCHEZ, T.; BULÉON, A.; COLONNA, P.; JAILLAIS, B.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p.161-174. 2012.

ROMANI, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**, v.179, p.150–158, 2015.

RUIZ, M.I.; SANCHEZ, C.I.; TORRES, R.G.; MOLINA, D.R. Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2337-2343, 2011.

SAHNI, T. K.; GOEL, A. Microbial enzymes with special reference to  $\alpha$ -amylase". **Giap Journals**, v.1, n.1, p. 19-25, 2015.

SALMAN, H.; BLAZEK, J.; LOPEZ-RUBIO, A.; GILBERT, E.P.; HANLEY, T.; COPELAND, L. Structure–function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v.75, p. 420–427, 2009.

SANDHU, K.S.; SINGH, N. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. **Food Chemistry**, v.101, p.1516–1524. 2007.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M., et al. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, n. 2, p.215-232, 2007.

SANTOS, W.M.; SEABRA JUNIOR, S.; NOLASCO, F.; CAMPOS, R.A.S.; SILVA, M.B.; RODRIGUES, L.F.O.S. Produção de mudas de taioba em função do tipo e seccionamento de rizomas. **Científica**, Jaboticabal, v.42, n.1, p.74–79, 2014.

SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SCHOLZ, M. J.; RILEY, M.R.; CUELLO, J.L. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioenergy** , v.48, p. 59-65, 2013.

SCHOCH, T. J. Iodimetric determination of amylose. In: WHISTLER, R. L.; SMITH, R. J.; BeMILLER, J. N. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Orlando: Academic Press, 1964. p.157-160.

SEGANFREDO, R.; FINGER, F.L.; BARROS, R.S.; MOSQUIM, P.R. Influência do momento de colheita sobre a deterioração pós-colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 184-187, 2001.

SHANAVAS, S., PADMAJA, G.; MOORTHY, S.N.; SAJEEV, M.S.; SHERIFF, J.T. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n.2, p. 901–909, 2011.

SHARLINA, M.S.E.; YAACOB, W.A.; LAZIM, A.M.; FAZRY, S.; LIM, S.J.; ABDULLAH, S.; NOORDIN, A.; KUMARAN, M. Physicochemical Properties of Starch from *Dioscorea pyrifolia* tubers. **Food Chemistry**, v. 220, p. 225–232. 2017.

SHIRAI, M.A.; HAAS, A.; FERREIRA, G.F.; MATSUGUMA, L.S.; FRANCO, C.M.L.; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos

modificados por tratamento oxidativo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.2, p. 239-247, 2007.

SILVA, G.O.; TAKIZAWA, F.F.; PEDROSO, R.A.; FRANCO, C.M.L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S.B.S.; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência Tecnoloogia Alimentos**, v.26. n.1, p. 188-197, 2006.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L. SINGH, N. S.; SINGH, B. G. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, J. O. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1–22, 2007.

SINGH, J.; SINGH, N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch from some Indian potato cultivars. **Food Chemistry**, v. 75, p. 67–77, 2001.

SINGH, J.; MCCARTHY, O.J.; SINGH, H. Physico-chemical and morphological characteristics of New Zealand *Taewa* (Maori potato) starches. **Carbohydrate Polymers**, v.64, p. 569–581, 2006.

SINGH, A.; GEVEKE, D.J.; YADAV, M.P. Improvement of rheological, thermal and functional properties of tapioca starch by using gum arabic. **LWT - Food Science and Technology**, v.80, p.155-162, 2017.

SLAVIC., M.S.; PESIC, M.; VUJCIC, Z.; BOZIC, N. Overcoming hydrolysis of raw corn starch under industrial conditions with *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a  $\alpha$ -amylase. **Applied Microbiology Biotechnology on-line**. [on-line]. 2016 Mar; 100(6): 2709-19. doi: 10.1007/s00253-015-7101-4. Epub 2015 Nov 7.

SMITH, A. R.; CARUSO, T. E. Determination of phosphorous content. In: WHISTLER, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**; Starch. New York: Academic Press. 1964. v. 4, p. 43–47.

SOUZA, C.S.; FINGER, F. L. Reguladores vegetais sobre a brotação e crescimento de taioba refrigerada (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 10, n. 1, p. 90-99, 2014.

SRICHUWONG, S.; CANDRA SUNARTI, T.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v.60 p.529–538, 2005.

SRICHUWONG, S.; ORIKASA, T.; MATSUKI, J.; SHIINA, T.; KOBAYASHI, T.; TOKUYASU, K. Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v.39,p.120 -127, 2012.

SUJKA, M.; JAMROZ, J. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. **International Agrophysics**, v. 21, p.107-113, 2007.

TAKEDA, Y., HIZUKURI, S., JULIANO, B. O. Structures of rice amylopectin with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, v. 168, p. 79-88, 1987.

TAN, I.S.T.; LEE, K.T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study. **Energy**, v. 78, p. 53-62. 2014.

TESTER, R. F. Properties of damaged starch granules: composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 293–301, 1997.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal science**, v. 39, p. 151–165, 2004.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.

THATOI, H.; DASH, P. K.; MOHAPATRA, S.; SWAIN, M. R. Bioethanol production from tuber crops using fermentation technology: a review. **International Journal of Sustainable Energy**, v.26, p.1-25, 2014.

TORRES, L.M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1327-1332, 2012.

TORRUCO-UCO, J.; BETANCUR-ANCONA, D. Physicochemical and functional properties of makal (*Xanthosoma yucatanensis*) starch. **Food Chemistry**, v. 101, p.1319–1326, 2007.

VALCÁRCEL-YAMANI, B.; RONDÁN-SANABRIA, G.G.; FINARDI-FILHO, F. The physical, chemical and functional characterization of starches from Andean tubers: Oca (*Oxalis tuberosa* Molina), olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n.3, 2013.

VALLE, T.L.; FELTRAN, J.C.; CARVALHO, M.R.L. Mandioca para a produção de etanol. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_4/mandioca/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/mandioca/index.htm)>. Acesso em: 27/4/2017.

WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of inbred line. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 521-525, 1993.

WANG, Y.; ZHANG, L.; LI, X.; GAO, W. Physicochemical Properties of Starches from Two Different Yam (*Dioscorea Opposita* Thunb.) Residues. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v..54, n. 2, p. 243-251, 2011.

WONG, K. S.; JANE, J. Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.18, p. 63-80, 1995.

WU, X.; ZHAO, R., WANG, D., BEAN, S.R., SEIB, P.A., TUINSTRA, M.R., CAMPBELL, M., O'BRIEN, A. Effects of amylose, corn protein, and corn fiber contents on production of ethanol from starch-rich media. **Cereal Chemistry**. v.83, n. 5, p. 569–575, 2006.

YONEMOTO, P.G.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; FRANCO, C.M.L. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n. 4, p. 761-771, 2007.

YOO, S.; PERERA, C.; SHEN, J.; YE, L.; SUH, D.; JANE, J. Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1556–1564. 2009.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A.N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.71, p.475–501, 2017.

ZANIN, G. M. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN, M.; JIN, Y.; GAO, X.; CHEN, Q.; GUAN, J.; WANG, Z. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, p.4573–4579, 2011.

ZHANG, Y.; GUO, Q.; FENG, N.; WANG, J.; WANG, S.; HE, Z. Characterization of A- and B-type starch granules in Chinese wheat cultivars. **Journal of Integrative Agriculture**. v.15, n.10, p. 2203–2214, 2016.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**. v.122, p.456–480, 2015.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch / Stärke**, v. 40, p. 1-7, 1988.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M.E.B.; DEMIATE. I.M.; GODOY, R.C.B.; SCHEER, A.P.; GREWELL, D.; JANE, J. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 19-26, 2017.