

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE MATÉRIAS-PRIMAS AMILÁCEAS
NA FABRICAÇÃO DE BIOETANOL PARA ANÁLISE DE SEGURANÇA
EM ALIMENTAÇÃO DE RATOS WISTAR.**

ILEANA ANDREA ORDOÑEZ CAMACHO

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP -
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia
(Energia na Agricultura).

BOTUCATU – SP
Junho – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE MATÉRIAS-PRIMAS AMILÁCEAS
NA FABRICAÇÃO DE BIOETANOL PARA ANÁLISE DE SEGURANÇA
EM ALIMENTAÇÃO DE RATOS WISTAR.**

ILEANA ANDREA ORDOÑEZ CAMACHO

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO CABELLO

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP -
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Energia na Agricultura).

BOTUCATU – SP
Junho 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

065p Ordoñez Camacho, Ileana Andrea, 1984-
Produção de resíduos sólidos de matérias-primas amiláceas na fabricação de bioetanol para análise de segurança em alimentação de ratos Wistar / Ileana Andrea Ordoñez Camacho. - Botucatu : [s.n.], 2013
x, 81 f. : ils. color., tabs., grafs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Claudio Cabello
Inclui bibliografia

1. Bioetanol. 2. Raízes amiláceas - Reaproveitamento (Sobras, refugos, etc.). 3. Ratos Wistar - Alimentação e rações. 4. Resíduos sólidos. 5. Segurança alimentar. I. Cabello, Claudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

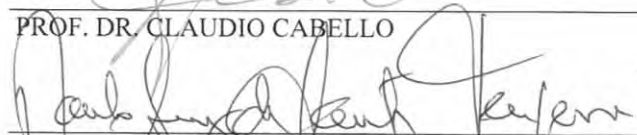
**TÍTULO: “PRODUÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE MATÉRIAS PRIMAS
AMILÁCEAS NA GERAÇÃO DE BIOETANOL PARA ALIMENTAÇÃO
SEGURA DE RATOS *WISTAR*”**

ALUNA: ILEANA ANDREA ORDONEZ CAMACHO

ORIENTADOR: PROF. DR. CLAUDIO CABELLO

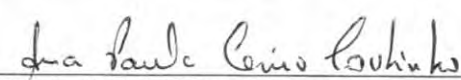
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CLAUDIO CABELLO

PROF. DR. PAULO SÉRGIO DOS SANTOS TEIXEIRA

PROF. DR. LUÍS FERNANDO BARBISAN

PROF. DR. ROGÉRIO LOPES VIEITES

PROFA. DRA. ANA PAULA CERINO COUTINHO

Data da Realização: 11 de junho de 2013.

Dedico esse trabalho aos meus pais, que mesmo longe sempre me acompanham.

Juntos conquistamos mais um sonho...

AGRADECIMENTOS

A Deus muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Claudio Cabello, pela orientação do presente trabalho e pelos ensinamentos com sua experiência acadêmica.

Ao Professor Dr. Luis Fernando Barbisan, sempre que precisei estava pronto para ensinar e ajudar em todas as minhas dúvidas e análises com os animais de laboratório.

Ao PC e a equipe do Biotério pela ajuda com os cuidados dos animais estudados.

A minha amiga Maira pela ajuda com as análises estatísticas.

A equipe do CERAT pelos auxílios na utilização do laboratório e pela colaboração em todas as atividades decorridas.

A toda minha família pelo apoio e incentivo em todas as fases desse trabalho, especialmente ao meu filho Nicolas, pelo simples fato de existir e por trazer muita alegria a minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram e me incentivaram, para a execução deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Bioetanol	5
2.2 Matérias-Primas	12
2.2.1 Mandioca	14
2.2.2 Sorgo	17
2.2.3 Arroz	19
2.2.4 Milho	20
2.2.5 Batata-doce	21
2.3 Resíduos do Processamento	23
2.4. Experimentação Animal	27
2.4.1 Condições ambientais	28
2.4.2 Rato	29
2.4.2.1 Requerimentos Nutricionais	32
2.4.2.2 Eutanásia	33
2.4.3 Análises Laboratoriais	34
2.4.3.1 Histologia	34
2.4.3.2 Perfil Sanguíneo	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Matéria-Prima	38
3.2 Processamento	39
3.3 Experimentação Animal	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Matérias-Primas	47
4.2. Resíduos Sólidos	48
4.3. Experimentação Animal	49
4.3.1 Rações	50

4.3.2. Análise Comportamental dos Ratos	56
4.3.3. Desempenho	62
4.3.3. Função Renal	63
4.3.4. Função Hepática	64
4.3.5. Histologia	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estágios da produção de etanol a partir de matérias-primas de origem vegetal.....	6
Figura 2.	Processo para obtenção de etanol a partir de matérias-primas de origem vegetal.....	7
Figura 3.	Pontos de ação das enzimas na hidrólise do amido.....	9
Figura 4.	Rendimento médio de bioetanol para diferentes culturas.....	13
Figura 5.	Balanços de massa do Etanol, Água, CO ₂ e Efluentes no processamento industrial da mandioca para produção de etanol.....	16
Figura 6.	Calendário Bioenergético.....	18
Figura 7.	Rato Wistar.....	30
Figura 8.	Passos para obtenção dos resíduos sólidos de matérias-primas amiláceas na produção de álcool.....	39
Figura 9	Fluxograma para produção dos resíduos sólidos de matérias-primas amiláceas na produção de álcool.....	43
Figura 10	Marcação dos animais.....	45
Figura 11	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada como testemunha.....	56
Figura 12	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de mandioca..	57
Figura 13	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de milho.....	58
Figura 14	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de batata-doce.....	59
Figura 15	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de sorgo.....	60
Figura 16	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de arroz.....	60

Figura 17	Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração usada como testemunha comercial.....	61
Figura 18.	Fotomicrografias representativas de cortes de estômago (porção glandular) dos diferentes grupos experimentais, 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x).	66
Figura 19.	Fotomicrografias representativas de cortes de fígado dos diferentes grupos experimentais, 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x).....	67
Figura 20.	Fotomicrografias representativas de cortes de intestino delgado (porção jejuno/íleo) dos diferentes grupos experimentais, 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x).....	68
Figura 21.	Fotomicrografias representativas de cortes de intestino grosso dos diferentes grupos experimentais, 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x)...	69
Figura 22.	Fotomicrografias representativas de cortes de rim dos diferentes grupos experimentais, 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x).....	70
Figura 23.	Planta piloto para fabricação de etanol CIAT-Colômbia.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais tipos de carboidratos usados na fabricação de etanol.....	11
Tabela 2.	Capacidade de produção de amido de culturas amiláceas no Brasil.	13
Tabela 3.	Parâmetros Fisiológicos de ratos.....	32
Tabela 4.	Requerimentos nutricionais de ratos Wistar.....	42
Tabela 5.	Distribuição dos animais no biotério.....	44
Tabela 6.	Composição centesimal das matérias-primas.....	47
Tabela 7.	Composição físico-química dos resíduos sólidos do processamento das matérias-primas.....	48
Tabela 8.	Composição porcentual e bromatológica da ração usada como Testemunha	50
Tabela 9	Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Mandioca.....	51
Tabela 10.	Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Milho.....	52
Tabela 11.	Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Batata-doce.....	53
Tabela 12.	Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Sorgo.....	54
Tabela 13.	Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Arroz.....	55
Tabela 14.	Resultados do desempenho médio dos grupos de consumos das rações formuladas.....	56
Tabela 15.	Valores médios dos valores, por grupo, dos pesos dos rins e fígado.....	57
Tabela 16.	Valores médios da concentração de ALT e AST no plasma de indivíduos dos grupos de ensaio	58
Tabela 17	Valores médios da concentração de ureia e creatinina no plasma de indivíduos dos grupos de ensaio	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABAM:** Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca
- ABEGÁS:** Associação Brasileira das Empresas Distribuidoras de Gás Canalizado
- ALT:** Alanina transaminase
- ANP:** Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- AST:** Aspartato transaminase
- ATR:** açúcar total recuperável
- BioTGA:** Fórum Nacional de Batata-Doce Industrial para produção de Etanol e Derivados
- CA:** Conversão Alimentar
- CR:** Consumo de Ração
- CEPEA:** Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP
- CERAT:** Centro de Raízes e Amidos Tropicais
- CONAB:** Companhia Nacional de Abastecimento
- EMBRAPA:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- FAPEMAT:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso
- FAO:** Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (sigla em inglês)
- FMB:** Faculdade de Medicina de Botucatu
- FMVZ:** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- GP:** Ganho de Peso
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
- LTF:** Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
- UFPB:** Universidade Federal da Paraíba
- SECITEC:** Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia
- UFT:** Universidade Federal do Tocantins
- UNICA:** União da Indústria De Cana de Açúcar

RESUMO

A produção de bioetanol utilizando matérias-primas amiláceas dá origem a um resíduo lignocelulósico que junto com o vinho esgotado nas colunas de destilação são os principais resíduos do processo. O resíduo líquido segue para tratamento em lagoas de estabilização enquanto o sólido é descartado no ambiente. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os resíduos sólidos de mandioca, sorgo, milho, arroz e batata-doce obtidos em ensaios numa planta piloto de fabricação de bioetanol e verificar os efeitos de sua inclusão em rações para ratos de linhagem Wistar. Cada matéria-prima foi processada separadamente e o resíduo sólido foi secado em estufa para posteriores estudos. A produção dos resíduos teve início com adição de água aos resíduos estocados para formação de uma polpa com 20% de amido, sendo adicionadas em duas etapas as enzimas alfa-amilase (90°C / 2 horas / pH 6.0), seguida de amiloglucosidase (60°C/ 14 horas /pH 4.5). Na sequência o hidrolisado foi submetido a fermentação (28°C / 24 horas) com levedura *Sacharomyces cerevisiae*, seguida da separação das partes sólidas e líquidas com filtro a vácuo; a parte sólida coletada formou o resíduo estudado, que para melhor conservação foi em seguida seco e moído. Os cinco tipos de resíduos foram caracterizados com análises físico-químicas (proteínas, lipídios, fibras, açúcares e amido). Na fase experimental com animais foram formuladas rações para ratos da linhagem Wistar com 10% de inclusão dos resíduos, cujos animais provenientes do Biotério Central da Administração Geral do Campus da UNESP (Botucatu), foram instalados no Biotério da Patologia por um período de 42 dias, durante os quais foram realizadas as colheitas dos dados referentes a consumo e peso. Após este período os ratos foram sacrificados e foram tomadas amostras de sangue para análises de transaminases (ALT/AST), ureia e creatinina, e coletados órgãos (rins, fígado, estômago, intestino) para análise de lâminas histológicas. Nas condições em que os experimentos foram realizados, os resultados permitiram concluir que ocorreram diferenças significativas no desempenho dos animais quando alimentados com resíduo proveniente de batata-doce (maior consumo 12,98g/dia, menor ganho de peso 4,10g/dia e menor conversão alimentar 2,02); as outras matérias-primas estudadas não apresentaram diferenças comparando-as com ração comercial. Nenhuma das rações experimentais apresentou efeitos adversos nas funções hepáticas e/ou renais. Nenhuma alteração histológica foi encontrada.

Palavras-chave: bioetanol, amido, resíduo, rato, roedor, Wistar.

SOLID WASTE PRODUCTION IN THE MANUFACTURE OF ETHANOL WITH STARCHSTO ANALYZES SECURITY IN FEEDING WISTAR RATS.

SUMMARY: The production of ethanol using starches produces two residues, a solid lignocellulosic and a liquid coming from the distillation columns. The following liquid waste treatment in stabilization ponds while the solid is discarded into the environment. This study aimed to produce and characterize solid waste of cassava, sorghum, maize, rice and sweet potatoes processed in a pilot plant production of ethanol and verify the effects of its inclusion in diets for rats Wistar.

Each material was processed separately. The production of waste started with addition of water and formation of a pulp with 20% starch, were added alpha-amylase enzyme (90 °C / 2 hr / pH 6.0), followed by amyloglucosidase (60 °C / 14 hours / pH 4.5) the hydrolyzate was subjected to fermentation (28 °C / 24 hours) with yeast *Saccharomyces cerevisiae* were separated solid and liquid parts with vacuum filter, the solid residue formed was studied (for the better conservation was dried and ground). The five types of waste were characterized with physicochemical analysis (proteins, lipids, sugars and starches).

In the phase experimental with animals were formulated diets for rats Wistar with 10% waste inclusions, the animals from the Central Animal Laboratory of the General Administration Campus of UNESP (Botucatu/SP) settled in the Animal Pathology for a period of 42 days, was made to collect data relating to consumption and weight, after this period the rats were sacrificed and samples were taken to analyze blood transaminases (ALT / AST) and creatinina/urea and collected organs (kidneys, liver, stomach, intestine) for analysis of histological slides.

With these experimental conditions, the results showed significant differences in the performance of animals when fed with sweet potato waste (higher consumption 12.98 g/day, less weight gain 4.10 g/day and lower feed conversion 2.02), other materials did not alter performance comparing with commercial feed. None experimental diets had adverse effects on liver function and/or kidney. None histological abnormality was found.

Keywords: Ethanol, starch, waste, rat, rodent, Wistar.

INTRODUÇÃO

A partir da crise energética da década de 1970 e das principais conferências sobre o meio ambiente, as questões sobre a eficiência da geração e do uso da energia foram intensificadas e ampliadas, considerando, principalmente, os seus impactos ambientais, buscando cada vez mais o uso de fontes renováveis de energia, que possam contribuir para reduzir as emissões de gás carbônico(CORTEZ, 2010).

As matérias primas amiláceas como as tuberosas tropicais, representam uma fonte alternativa para a produção de etanol (CABELLO, 2005).

Nos sistemas de produção de etanol por fermentação onde se utilizam matérias primas amiláceas há a formação de um resíduo sólido que juntamente com o vinho esgotado nas colunas de destilação, constituem-se nos principais resíduos gerados no processo(CEREDA, 2001).

Normalmente os resíduos líquidos seguem para tratamento em lagoas de estabilização, enquanto que, os resíduos sólidos são descartados no ambiente incorporando esta biomassa ao solo;entre as alternativas encontradas para o uso de este tipo de resíduos estão a sua aplicação nas áreas de adubação, alimentação animal e na cogeração de energia.

Além do aspecto ambiental o descarte indevido constitui desperdício de uma matéria-prima que poderia ser aproveitada(CEREDA, 2001).

A crescente preocupação com a questão ambiental associado à busca por novas fontes de energia renovável ampliou as pesquisas ligadas ao aproveitamento deste tipo de resíduo agroindustrial, proporcionando o aproveitamento dos materiais, assim como um ganho econômico e ambiental (SAITO, 2005).

O presente trabalho teve como objetivos a produção e

caracterização de resíduos sólidos gerados em sistemas de produção de etanol a partir de mandioca, batata-doce, sorgo, milho e arroz (matérias-primas amiláceas) para análise de segurança em alimentação de ratos WISTAR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol

O etanol é usado de diversas formas há milhares de anos e, recentemente, emergiu como combustível para motores de combustão interna, (ABRAMOVAY, 2009). O Brasil é pioneiro na utilização do etanol como combustível veicular (VIEIRA, 2006).

O país utilizou etanol em automóveis pela primeira vez na década de 1920, mas a indústria produtora de etanol ganhou grande impulso somente na década de 1970, com o lançamento do PROGRAMA NACIONAL DO ÁLCOOL - Proálcool, programa federal de estímulo criado como resposta à crise mundial do petróleo (PENIDO, 1981).

O etanol é comercialmente conhecido como álcool etílico, tem fórmula molecular: C_2H_5OH ou C_2H_6O .

Quando fabricado a partir de matérias-primas vegetais, é considerado um biocombustível, ou seja, um combustível renovável, que não utiliza materiais de origem fóssil como o petróleo (DORADO, 2009).

É produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais, embora também possa ser feito sinteticamente de fontes como o eteno derivado do petróleo (BASTOS, 2007)

Etanol pode ser produzido a partir de qualquer material que contenha quantidades significativas de carboidratos, particularmente amido ou açúcares como sacarose, glicose, frutose e maltose (MENEZES, 1980).

O processo de fabricação de etanol a partir de matérias-primas de origem vegetal consiste em três grandes estágios descritos na Figura 1.

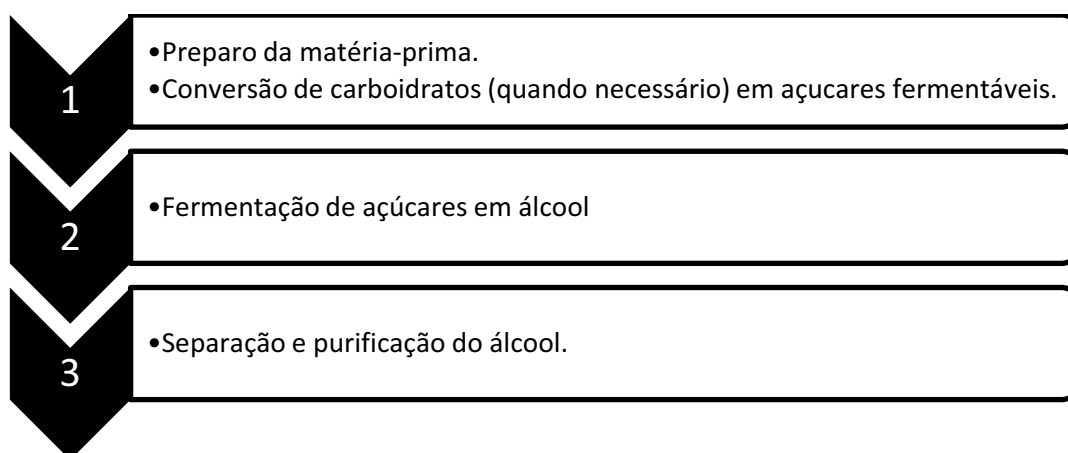


Figura 1. Estágios da produção de etanol a partir de matérias-primas de origem vegetal.

Durante o Proálcool havia diversas condições favoráveis para investir no aperfeiçoamento das tecnologias nas diversas etapas do processo, desde a produção e tratamento da matéria-prima até o reaproveitamento dos resíduos da fabricação do álcool, o programa era representado por um expressivo setor açucareiro.

Muitas inovações foram introduzidas para que fossem alcançados os resultados que alavancaram o Brasil à posição de maior produtor mundial de álcool combustível derivado de cana-de-açúcar (ABRAMOVAY, 2009).

Na etapa de produção da matéria-prima, foram introduzidos novos equipamentos de colheita, novas variedades selecionadas de cana-de-açúcar, novas tecnologias de manejo da plantação, dos resíduos e o reaproveitamento do vinhoto para adubagem do solo (CABELLO, 2005).

Na etapa industrial, foram aperfeiçoados os processos e equipamentos de extração do caldo e de destilação do produto, foi usado o controle biológico da fermentação e foram reduzidos os gastos de energia com o reaproveitamento dos resíduos da matéria-prima para queima (SALLAS, 2008).

Com o fim dos subsídios o uso do álcool foi reduzido até quase desaparecer. Porém a mistura do álcool anidro à gasolina passou a ser obrigatória pelo decreto 19.717, de 20 de fevereiro de 1931, que estabeleceu a aquisição obrigatória de álcool anidro de procedência nacional, na proporção de 5% da gasolina importada, revigorando o setor.

Resumidamente as operações unitárias ilustradas na Figura 2 podem ser descritas como:

1. **Lavagem:** Elimina impurezas que possam interferir no processamento.
2. **Desintegração:** Aumenta a superfície de contato da matéria-prima, expondo mais facilmente ao calor e aos agentes sacarificantes, de modo a tornar mais eficientes as operações posteriores de hidrólise e fermentação.
3. **Liquefação:** Em esta operação são liberados os grãos de amido ligados aos compostos lignocelulósicos facilitando a reação entre os agentes sacarificantes e o amido nas etapas seguintes, como resultado do aquecimento, o grão de amido absorve água, intumescce, a parede celular se rompe e o amido se gelatiniza, no final desse processo, a massa torna-se liquefeita pela ação do calor combinado com a enzima alfa-amilase (LEONEL, 2001).
4. **Sacarificação:** Os materiais amiláceos contêm carboidratos mais complexos como amido que podem ser quebrados em glicose pela hidrólise ácida ou ação de enzimas num processo denominado sacarificação (FILHO, 2003).

A hidrólise realiza-se por via química ou biológica. O processo químico utiliza ácido para a quebra do amido. Já a hidrólise biológica (mais empregada atualmente), faz-se por ação enzimática ou pela ação de microbiana de certos fungos (LIMA, 1987).

A enzima alfa-amilase rompe as ligações alfa 1-4, de maneira que se formam pequenas cadeias de dextrose denominadas dextrinas tornando a pasta gelatinizada do amido menos viscosa e fornecendo maior numero de terminais de cadeias para a ação das enzimas sacarificantes, nesta fase um 85% do amido e convertido em açúcares fermentescíveis (LEONEL, 1998).

A amiloglucosidase ataca as ligações alfa 1-6 das moléculas de maltose, e, em menor grau, as dextrinas formando glicose. Com o trabalho conjunto dessas enzimas é possível hidrolisar completamente a molécula do amido.

A Figura 3 apresenta a hidrólise do amido gelatinizado, que envolve o desdobramento das ligações alfa 1-4, que ligam as moléculas de glicose em longas cadeias e as ligações alfa 1-6, que formam os pontos de ramificação do componente amilopectina do amido.

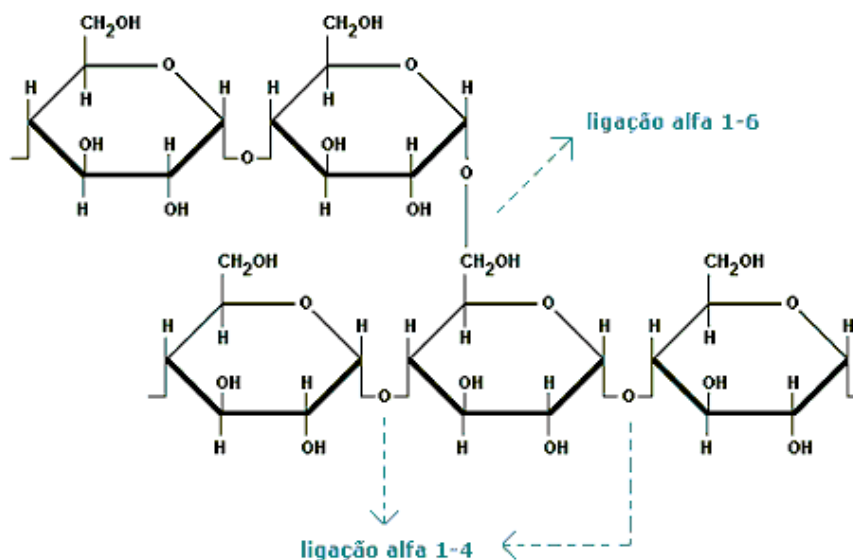


Figura3. Pontos de ação das enzimas na hidrólise do amido.

A velocidade de hidrólise depende do tipo (linear ou ramificada) e da extensão da cadeia de amido: as ligações alfa 1-4 se hidrolisam mais facilmente que as ligações alfa 1-6, porém a maltotriose, e especialmente a maltose, hidrolisa mais lentamente que os oligosacarídeos. (LEONEL, 1998).

5. **Fermentação:** O processo de fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica, na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de microrganismos (leveduras ou bactérias), até a formação de etanol e CO₂, havendo liberação de energia química e térmica (FILHO, 2003).

A via fermentativa com uso de leveduras é o método utilizado na obtenção de etanol no Brasil e na maior parte dos países do mundo (VIEIRA, 2006). Apesar de não ser o único microrganismo capaz de produzir álcool, propriedades específicas das leveduras como a tolerância a altas concentrações de álcool e gás carbônico, o crescimento rápido e a capacidade de fermentação as tornam

os micro-organismos mais adequados para a operação em escala industrial (PENIDO,1981).

Existem várias linhagens desse micro-organismo, que foram selecionadas ao longo do tempo, para maior tolerância a variações de pH, maior resistência ao álcool e rendimento da fermentação porém as leveduras mais importantes para a produção de álcool são as *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (CAMILI, 2009)

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol (CAMILI, 2009).

A biomassa das leveduras pode ser recuperada como subproduto da fermentação e transformada em levedura seca, que se constitui em matéria-prima para fabricação de ração animal ou suplemento vitamínico (CAMACHO, 2009).

- 6. Destilação:** O mosto fermentado (vinho) que vem da fermentação possui, em sua composição, 7 a 10 % em volume de álcool, além de outros componentes de natureza líquida, sólida e gasosa (PENIDO, 1981).

O álcool presente no vinho é recuperado pela destilação, processo de separação de componentes de uma mistura baseado nas suas capacidades de evaporação em uma dada temperatura e pressão.

Na destilação, a mistura é aquecida até a fervura, sendo que os vapores são resfriados até se tornar líquido novamente. Assim, o efeito final é o aumento da concentração do componente mais volátil (álcool) no vapor e do componente menos volátil (caldo fermentado) no líquido. Por este processo obtém-se, a partir de um vinho de 7 a 9% de teor alcoólico, um teor próximo a 96% em

etanol (PENIDO, 1981).

O álcool hidratado, produto final dos processos de destilação e retificação, é uma mistura binária álcool-água que atinge um teor da ordem de 96°GL. Este álcool hidratado pode ser comercializado desta forma para ser utilizado em carros a álcool e bicom bustíveis ou pode sofrer um processo de desidratação para se tornar anidro, utilizado como mistura carburante na gasolina.

Considerando a produção com base em matérias-primas açucaradas como é o caso da cana-de-açúcar, o processo é mais simples, envolvendo menos operações unitárias, uma vez que os açúcares disponíveis são diretamente fermentáveis, dispensando etapas de hidrólise (MENEZES, 1980)

Matérias-primas ricas em carboidratos podem ser agrupadas em duas categorias, as diretamente fermentescíveis que não necessitam de conversão prévia do carboidrato, e as indiretamente fermentescíveis que precisam sofrer essa conversão previa antes da fermentação, de modo a torná-lo assimilável pela levedura alcoólica (MENEZES, 1980)

Os principais tipos de carboidratos, sua principal fonte fornecedora e a categoria em que são enquadrados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Principais tipos de carboidratos usados na fabricação de etanol.

Categoria	Tipo de Sacarídeo	Principais Fontes
Diretamente Fermentescíveis	Glicose Frutose	Polpa de frutas
	Sacarose	Cana-de-açúcar, beterraba, sorgo sacarino (colmo)
Indiretamente Fermentescíveis	Amido	Mandioca, batata-doce, milho, grãos de cereais em geral, babaçu, batata, tuberculos em geral.
	Celulose	Madeira, bagaço de cana, palha de arroz, casca de amendoim, sabugo de milho.

Fonte. MENEZEZ, 1980

Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos (açúcares) constitui-se em matéria-prima para obtenção de álcool pela via fermentativa. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso que se considere o seu volume de produção, rendimento industrial e o custo de fabricação.

Embora no Brasil o uso de cana açúcar para produção de álcool seja muito bem sucedido, outras matérias-primas podem ser consideradas, bem seja para possibilitar a produção em regiões sem vocação agrícola de alguma cultura ou pelo aproveitamento das perdas resultantes da produção agrícola existente, tanto na colheita como na classificação final (FILHO, 2003).

2.2. Matérias-primas amiláceas

O amido é o polissacarídeo de reserva dos vegetais e está armazenado sob a forma de grânulos, que apresentam certo grau de organização molecular, o que confere aos mesmos um caráter parcialmente cristalino, ou semicristalino, com graus de cristalinidade que variam de 20 a 45% (YOUNG, 1984).

O amido constitui-se em grânulos compactados de amilose e amilopectina. A amilose é um polissacarídeo composto de unidades de glicose unidas em longas cadeias predominantemente lineares através de ligações alfa 1-4. A amilopectina é formada por unidades de glicose com ligações alfa 1-4 nas porções retilíneas e apresenta ramificações devidas á presença de ligações alfa 1-6 entre as cadeias de glicose (ELLIS, 1998).

O amido pode ser obtido de diversas fontes vegetais, como cereais, raízes e tubérculos, e também de frutas e legumes, no entanto, a extração em nível comercial de amido se restringe aos cereais, raízes e tubérculos (LIMA, 2004).

As principais fontes de amido comercial no mundo são milho, arroz, trigo e mandioca e batata (ELLIS, 1998; LEONEL, 2001).

Culturas como arroz, batata, batata-doce, taro, inhame, mandioca e milho são produzidas no Brasil. A Tabela 2 apresenta a capacidade de produção de amido por hectare e por ano de estas culturas, permitindo visualizar o potencial de uso das mesmas na produção de álcool (CABELLO, 2010)

Tabela 2. Capacidade de produção de amido de culturas amiláceas no Brasil.

Matéria-prima	Amido %	Amido/área t/ha
Arroz	0,77	2,93
Batata	0,12	2,68
Batata-doce	0,15	3,0
Taro	0,15	7,5
Inhame	0,17	6,8
Mandioca	0,30	9,0
Milho	0,56	5,0

Fonte: CABELLO, 2010.

O balanço energético de cada matéria-prima ou a relação entre a energia produzida e a energia consumida para produzir etanol é um fator altamente importante para a adequação e seleção dos materiais a serem usados. (EMBRAPA, 2009). Na Figura 4 é mostrada uma relação comparativa entre etanol obtido a partir de diferentes matérias-primas.

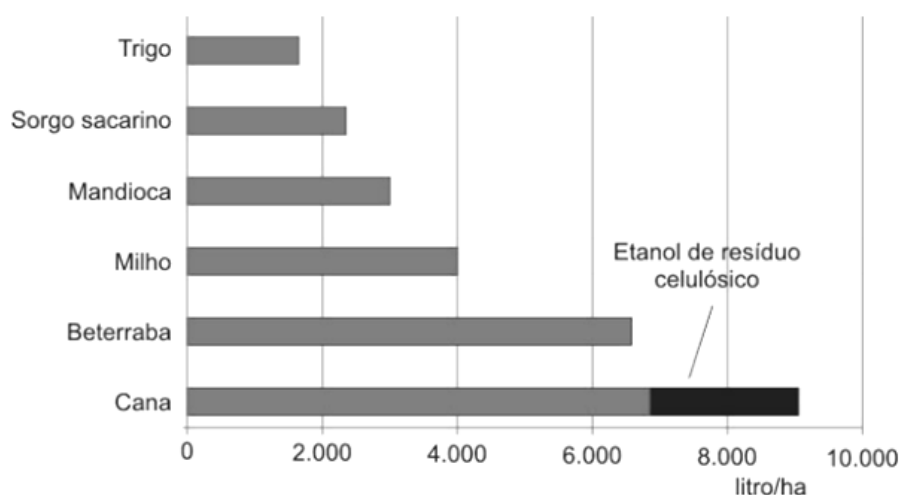


Figura 4. Rendimento médio de bioetanol para diferentes culturas.

Fonte: EMBRAPA, 2009

Pode-se observar que o rendimento médio é maior quando se utiliza matéria-prima composta por açúcares diretamente fermentescíveis como é o caso da cana-de-açúcar e da beterraba. Das matérias-primas amiláceas o milho apresenta rendimento superior.

2.2.1 Mandioca

A palavra mandioca deriva do vocábulo *manioc* (palavra de origem tupi), mas sua denominação científica é *Manihot esculenta* Crantz, a espécie de maior interesse agrônomo. O gênero *Manihot* apresenta cerca de 180 espécies descritas, a maioria das quais nativas do Brasil (LIMA, 2001).

A mandioca é uma planta perene, heliófila, herbácea quando nova, lenhosa, subarborescente ou raramente arbórea na maturidade, não ramificada ou ramificando-se de vários modos, arbustiva, de raízes tuberosas, folhas pecioladas, inflorescência em panículas onde se encontram separadas, flores masculinas e femininas. A cultura tem grande importância tanto agrônoma como cultural, pois essa planta é a principal fonte de alimento nas regiões pobres do país, além de ter seu centro de origem e domesticação na região Amazônica (SAMPALHO, 2005).

O sistema radicular da mandioca tem uma baixa densidade de raízes, porém tem uma penetração profunda, o que dá à planta parte da capacidade para resistir a longos períodos de déficit hídrico, suportar o clima quente, tolerar a seca e adaptar-se às mais variadas condições de clima e de solo (LIMA, 2001).

A mandiocultura no Brasil encontra-se em diferentes condições, variando desde a cultura tradicional, de subsistência, com pouca ou nenhuma tecnologia e de baixa produtividade (8 a 12 t/ha), até polos na região oeste do Paraná, Mato Grosso do Sul e noroeste de São Paulo, com plantios de mandioca empresarial, mecanizados, com tecnologia, visando alcançar produtividades de 40 t/ha (SCHWENGBER, 2009).

A abundância do cultivo em todo o território nacional, sua robustez, facilidade de propagação, elevada tolerância à estiagem e ao excesso de chuvas, bons rendimentos mesmo em solos de baixa fertilidade, baixa exigência em insumos modernos, potencial resistência/tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, possibilidade de consórcio com inúmeras plantas, resistência à propagação do fogo, alternativa para reutilização das áreas degradadas, cultivo e colheita em qualquer época do ano são alguns atributos para a geração de energia de baixo impacto ambiental (SALLA, 2008).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE mostraram que para 2012 o Brasil teve uma área colhida de 1,72 milhões de hectares com produtividade agrícola de 14,6t/hectare, com isto a produção para 2012 foi de 25,2 milhões de toneladas 3,7% inferior à obtida na safra 2011 onde foram produzidas 26,1

milhões de toneladas. Atualmente, seis dos dez maiores municípios produtores do tubérculo do Brasil estão na região norte onde a maior parte do cultivo é realizada em pequenas propriedades.

A mandioca é um vegetal considerado como matéria-prima para produção de álcool (CABELLO, 2005). Basicamente, cinco grupos de substâncias são encontrados nas plantas: carboidratos (87%), proteínas (3%), lipídeos (1%), lignina (3%) e ácidos orgânicos (3%) (PEREIRA, 1989).

O álcool de mandioca já foi produzido no Brasil no período de 1932 a 1945, quando a disponibilidade energética da época da guerra era bastante limitada. Naquele tempo, técnicos já apregoavam a fabricação do álcool carburante, tendo o País produzido 60 milhões de litros anuais para mistura com gasolina, produção que superava a de álcool para bebidas (MENEZES, 1980).

Atualmente o Programa Bioálcool, iniciativa do Instituto Ecológica, Organização da Sociedade Civil de Interesse Público que desenvolve planos de orientação a pequenos produtores nortistas tem como foco a produção de álcool retificado ou neutro, com baixo grau de impurezas, utilizado em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de tintas. (COSTA, 2010).

Quando considerada a produtividade por tonelada da mandioca em relação à cana-de-açúcar na fabricação do etanol, a mandioca tem um melhor desempenho, enquanto uma tonelada de cana-de-açúcar, com 140 kg de açúcar total recuperável (ATR), produz 85 litros de álcool, uma tonelada de mandioca, com 25% de amido, pode produzir 170 litros de álcool. Considerando a produtividade agrícola média em torno de 18 toneladas por hectare, implica um rendimento industrial de 3.060 litros de bioetanol por hectare. (CABELLO, 2005).

Com a tecnologia atual, cada tonelada de mandioca pode produzir 200 litros de álcool. Ou seja, a cada 5 quilos da raiz se produz um litro de combustível (PEDUZZI, 2009). Para cada quilograma de massa produzida pela desintegração das raízes de mandioca foram obtidas 166 gramas de etanol, 99,5 GL (SALLAS, 2008).

A Figura 5 ilustra os balanços de massa do etanol, água, CO₂ e efluentes no processamento industrial da mandioca para produção de etanol.

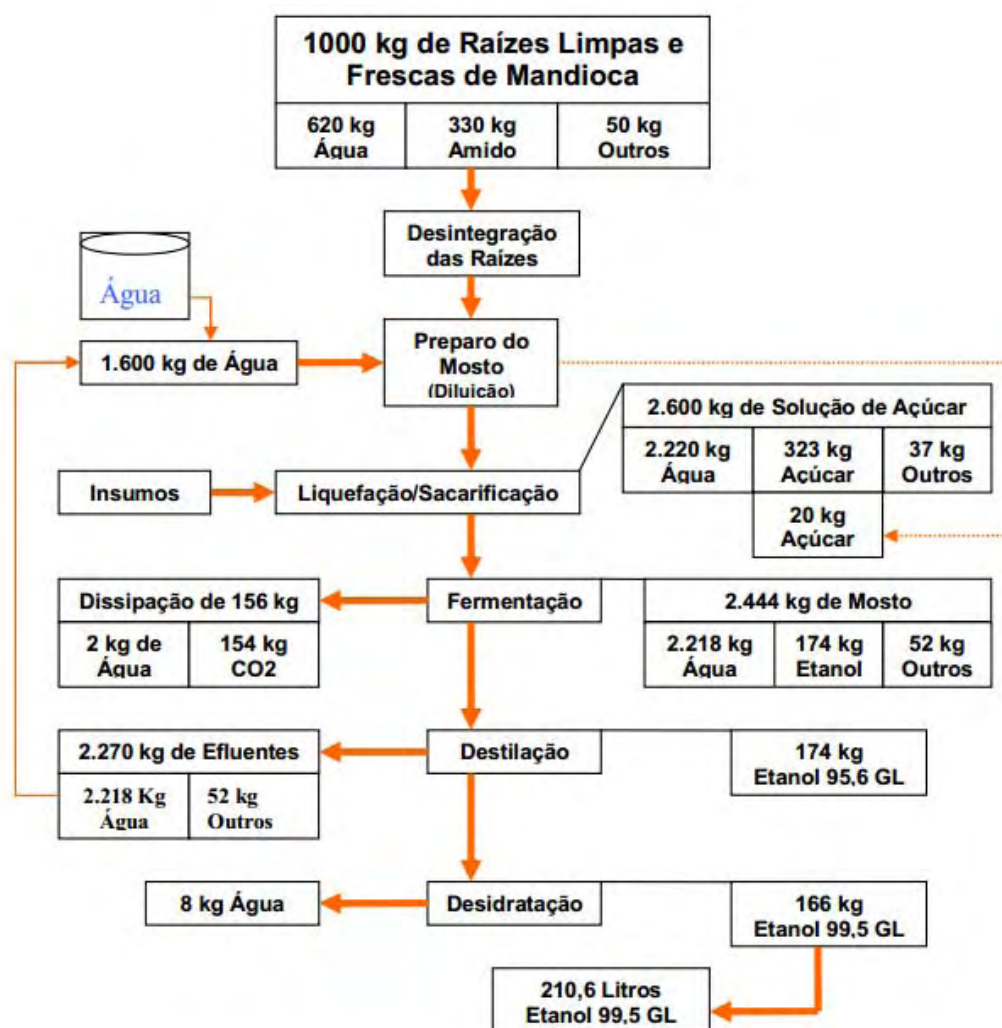


Figura 5. Balanços de massa do etanol, água, CO₂ e efluentes no processamento industrial da mandioca para produção de etanol. Fonte: SALLAS, 2008

Foi determinado que a quantidade mínima de água necessária para bom funcionamento dos processos de sacarificação foi de 1,6 litros de água para cada quilograma de massa gerada pela desintegração das raízes (SALLAS, 2008).

A água adicionada para fazer a diluição da massa ralada, somada àquela contida naturalmente nos tecidos das raízes de mandioca (62%) produziu efluentes na ordem de 2,27 kg para cada quilograma de raízes desintegradas (SALLAS, 2008).

Durante o processo de fermentação de um quilograma de raízes desintegradas de mandioca foram gerados 154 gramas de CO₂ (SALLAS, 2008).

2.2.2Sorgo

A origem do sorgo tem sido motivo de muita controvérsia entre pesquisadores. Existem relatos de sua exploração em ruínas de Egito, na China, e na Índia, onde era cultivado muito antes da Era Crista. Entretanto, tem-se como prováveis centros de origem do sorgo o Centro-Leste da África e partes da Ásia (BRINHOLI, 1996).

No continente Americano existe registros da sua introdução por sementes trazidas de navios que transportavam escravos. No Brasil a introdução do sorgo é relativamente recente e efetivou-se no Rio Grande do Sul, onde a cultura desenvolveu-se a partir do início da década de 70 (BRINHOLI, 1996).

O sorgo é uma planta anual, pertencente à família Poaceae e caracteriza-se pela grande produção de massa e grãos de constituição semelhantes aos do milho. A altura da planta varia de 1,00 a 1,70 m, dependendo do cultivar e do ambiente (SHERTZ & DALTON, 1980).

Existe cultivares de duplo propósito (grãos e forragem) com altura média em torno dos 2,00 m. O colmo é formado de nós internos, com uma folha em cada nó. As folhas assim como o caule, apresentam uma fina camada de cera em sua superfície, que não são recobertas por pelos, permitindo a identificação da planta nos estágios iniciais de desenvolvimento. No ápice do colmo encontra-se a panícula que pode variar de 20 a 40 cm de comprimento (SHERTZ & DALTON, 1980).

O sorgo é o quinto cereal mais importante no mundo e seus grãos também podem ser utilizados para a produção de farinha para panificação, amido industrial e álcool (LIMA, 2012).

No Brasil, as zonas de adaptação da cultura se concentram no Sul (região de fronteira) em plantios de verão, no Brasil Central em sucessão a plantios de verão (safrinha) e no Nordeste em plantios nas condições do semiárido com altas temperaturas e precipitação inferior a 600 mm anuais; é uma cultura com custo significativamente mais baixo quando comparado ao milho, com poucos problemas de pragas e doenças e, é muito tolerante à condição de stress hídrico (LIMA, 2012).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. No ano de 2012, Goiás, foi o Estado com maior representação na produção total do sorgo com área estimada em 325,8 mil hectares e produção de 1,0 milhão de toneladas, seguido por Minas Gerais, com área de 134,8 mil hectares e produção de 419,6 mil toneladas, e por Mato Grosso, com 308,7 mil toneladas produzidas, em uma área de

154,1 mil hectares.

Pesquisas da Embrapa Milho e Sorgo, de Sete Lagoas, na Região Central de Minas Gerais, estudam 25 novos cultivares de sorgo sacarino para produção de álcool, os trabalhos começaram ainda na década de 1970 (SHAFERT, 2010).

Todo o processo, da colheita ao produto pronto, leva três dias, e o resultado é um álcool puro, sem aditivos ou corantes e com graduação entre 95 e 96 graus GL, que pode ser consumido diretamente nos motores, inclusive de carros (SHAFERT, 2010).

O etanol produzido a partir de sorgo vem suprir uma lacuna na plantação de cana, onde a colheita acontece entre abril e novembro. A falta de etanol entre dezembro e março eleva o preço na entressafra. Há diversos tamanhos de refinarias e a produção pode variar entre 500 litros e 5000 litros por dia (OLIVEIRA, 2012). A Figura 6 mostra o calendário 'Bioenergético' com uma proposta de introdução da cultura Sorgo na matriz energética Brasileira.



Figura 6. Calendário Bioenergético. Fonte: OLIVEIRA, 2012

De período curto de crescimento, em no máximo 120 dias o sorgo é plantado e colhido, é uma cultura que pode ser semeada ocupando áreas de renovação da terra na plantação de cana, que deve acontecer a cada cinco anos, ou na constituição de novas lavouras, principalmente em terrenos antes dedicados a pastagem de bovinos, situação presente no noroeste paulista, no norte paranaense, em Mato Grosso do Sul e Goiás (LIMA, 2012).

Experimentos com a produção de etanol com sorgo, também na entressafra da cana, realizados na Colômbia mostraram bons resultados, outra vantagem para o sorgo é que o caldo extraído de seus colmos se adapta bem ao processo industrial das usinas de cana onde o etanol é produzido, as modificações nos equipamentos são mínimas, em ajustes pontuais (OLIVEIRA, 2012).

As máquinas para a colheita usadas na cana também servem para colher o sorgo. Assim, as usinas reduzem o período de entressafra, principalmente entre março e abril (OLIVEIRA, 2012).

Considerando uma produtividade industrial de 40 litros de etanol por tonelada de sorgo processado e os valores de produtividade agrícola de 50 toneladas por hectare, foi observado em áreas plantadas com o cultivar BR 505, desenvolvido pela Embrapa, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, objetivando a produção de bioetanol, uma produtividade agroindustrial de 2.500 litros de bioetanol por hectare (REDDY, 2004).

O uso do sorgo sacarino ainda apresenta dificuldades que precisam ser superadas antes de sua efetiva adoção como matéria-prima para obtenção de etanol, como sua reduzida resistência à degradação após a colheita, a limitada base de germoplasma, a pouca adaptabilidade ambiental e a baixa resistência a pragas e doenças (SIMON, 2009; OLIVEIRA, 2012; LIMA, 2012).

2.2.3 Arroz

O arroz é constituído por sete espécies, *Oryza barthii*, *Oryza glaberrima*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogone* e *Oryza sativa*; é uma das plantas alimentícias mais antigas. Na literatura chinesa e no vale de Yang Tsè Kiang existem restos de arroz de 4000 anos de antiguidade (ANGLADETTE, 1969).

O arroz é considerado o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento, constituindo-se em alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, quando comparado com as demais culturas, se destaca em segundo lugar em extensão de área cultivada no mundo, superado apenas pelo trigo (FAO, 2012).

O arroz é a fonte primária de energia e proteína para os povos das nações mais populosas da Ásia, África e América Latina, considerado um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária ao homem (DOS SANTOS, 2004).

O arroz é uma cultura que apresenta ampla adaptabilidade às diferentes condições de solo e clima, sendo a espécie com maior potencial de aumento de produção e, possivelmente, de combate à fome no mundo (ANGLADETTE, 1969).

Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado na

Ásia por mais de 250 milhões de pequenas propriedades, no sistema irrigado, onde a maioria da população alimenta-se deste cereal (FAO, 2012).

A produção mundial de arroz deve ter aumento na safra 2012/2013, chegando a 735 milhões de toneladas base casca, significa um aumento de 2,2% em relação à safra 2011/2012. O crescimento é concentrado principalmente nos principais produtores asiáticos, como China, Índia e Indonésia. (FAO, 2012).

A produção brasileira de arroz na safra 2011/2012 foi de 9,9 milhões de toneladas, este volume é 4,6% menor em relação à produção da safra passada, de 11,4 milhões de toneladas. (CONAB, 2012).

Duas empresas de agroindústria no Rio Grande do Sul começaram a produzir etanol do arroz, em escala experimental. A perspectiva é criar uma alternativa para a produção do combustível e no futuro ter mais uma destinação para o arroz não consumido como alimento (DIOS, 2012).

O arroz tem uma produtividade para etanol que pode se equivaler ao rendimento da cana de açúcar, e é superior a do sorgo e do trigo. Com 420 litros de etanol por tonelada de arroz, contra 400 litros de etanol por tonelada de trigo como produzido na Rússia, Canadá e Inglaterra (DIOS, 2012).

2.2.4. Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta que pertence à família Gramineae/Poaceae. O caráter monóico e a sua morfologia característica resultam da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas (MAGALHÃES et al., 2002).

O milho é especialmente rico em carboidratos (açúcares), essencialmente o amido, o que o caracteriza como alimento energético. Essa fração corresponde, em média, a 72% dos grãos, porém outros importantes nutrientes estão presentes, como os lipídios e as fibras dietéticas, que constituem 4,5 e 2,0% dos grãos, respectivamente (FRANCO, 1992).

O grão de milho é utilizado principalmente para consumo humano e animal, sendo um alimento essencialmente energético, pois seu principal componente é o amido (FRANCO, 1992).

A cultura do milho encontra-se amplamente disseminada no Brasil. Isto se deve tanto à sua multiplicidade de usos na propriedade rural quanto à tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores brasileiros (MAGALHÃES et al., 2002).

Dentre os cereais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo, com duas safras, normal e safrinha. No Brasil, a área total de milho plantada nas duas safras de 2012 foi de 15.12 mil hectares, com uma produção de 67.79 mil milhões de toneladas. O maior crescimento se deu no Mato Grosso que acrescentou 732,7 mil hectares cultivados na safra 2012. (CONAB, 2012). Nos últimos anos, Mato Grosso tem exportado grande parte do milho produzido.

O milho passou a ser uma cultura importante para a sobrevivência dos produtores de Mato Grosso, o Brasil só consome 74% do milho produzido e no caso de Mato Grosso apenas 30% do total produzido é consumido no mercado interno, os produtores se veem obrigados a exportar, mas a cada duas sacas enviadas ao porto uma delas se perde em frete (SILVEIRA, 2012).

No município de Campos de Júlio, em Mato Grosso começou a funcionar uma usina *flex*, além da cana, também usa o milho para produzir álcool, a usina produz etanol de cana desde 2006 e começou os testes com milho em 2011. Foram investidos quase R\$ 20 milhões em novos equipamentos e adaptações, parte das máquinas usadas no processamento da cana também serve para a moagem e fermentação do milho (GLOBO, 2012).

Na atualidade existem 95 refinarias nos Estados Unidos, as quais utilizam o milho como a principal matéria-prima para a produção de álcool. Para cumprir a cota de substituição deste produto, o governo norte-americano estabeleceu uma meta de produção de combustíveis renováveis de 132,5 bilhões de litros até 2017, dos quais, em grande parte, será cumprida pelo etanol (BRITO, 2008).

Para cada tonelada de milho é produzido em média 401 litros de etanol, 323 kg de CO₂ e 323 kg de resíduos secos de destilaria, conhecidos como DDGS (Dried Distiller's Grains with Solubles) que estão sendo considerados como subproduto a ser utilizado na alimentação animal (BRITO, 2008).

2.2.5 Batata-doce

A batata-doce (*Ipomoea batatas Lam*) é originária das Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde a Península de Yucatan, no México, até a Colômbia. Relatos de seu uso remontam de mais de dez mil anos, com base em análise de batatas secas encontradas em cavernas localizadas no Vale de Chilca Canyon, no Peru, e em evidências contidas em escritos arqueológicos encontradas na região ocupada pelos Maias, na América Central (SILVA, 2004).

A batata-doce é a 4ª hortaliça mais consumida no Brasil. É uma cultura tipicamente tropical e subtropical, rústica, de fácil manutenção, boa resistência contra a seca e ampla adaptação (CARDOSO, 2005).

Apresenta custo de produção relativamente baixo, com investimentos mínimos, e de retorno elevado, é também uma das hortaliças com maior capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo [kcal/ha/dia](CARDOSO, 2005)

A batata-doce é cultivada em climas tropicais, subtropicais e em regiões temperadas. Apresenta alta tolerância a seca e baixo custo de produção (MONTEIRO *et al.*, 2007).

A batata-doce é uma planta de grande importância econômico-social, participando do suprimento de calorias, vitaminas e minerais na alimentação humana, as raízes apresentam teor de carboidratos variando entre 25% a 30%, dos quais 98% são facilmente digestíveis (AZEVEDO, 2002). Comparada com outras estruturas vegetais amiláceas, a batata-doce possui maior teor de matéria seca, carboidratos, lipídios, cálcio e fibras que a batata, mais carboidratos e lipídios que o inhame e mais proteína que a mandioca (CABRAL, 2004).

No Brasil, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de batata-doce, com uma produção de 158.629 toneladas, que representa 31,4% da produção nacional de 505.310 toneladas. Os municípios que possuem maior produção são Mariana Pimentel, com uma produção de 10.314 toneladas, Pelotas, com 7.187 toneladas, e Santa Maria, com uma produção de 6.267 toneladas (CABRAL, 2004).

A produtividade média brasileira, está em torno de 8,7 t/ha. Entretanto, produtividade superior a 25 t/ha pode ser facilmente alcançada, desde que a cultura seja conduzida com tecnologia adequada (CABRAL, 2004).

Desde os anos 70 muitos pesquisadores já buscavam desenvolver combustível de batata-doce, em média, uma tonelada de batata doce rende até 180 litros de álcool e 300 quilos de resíduo, utilizado para produção de farinha e de ração animal. O álcool de batata-doce é um produto de alto valor agregado destinado à fabricação de bebidas, cosméticos, tintas e remédios, utilizados em vários países como a Bélgica e o Japão. (CASTRO & EMYGDIO, 2008). A produção de etanol a partir da batata-doce tem sido alvo de pesquisas e discussões, em Mato Grosso, o tema foi discutido durante o ‘Fórum Nacional de Batata-Doce Industrial para produção de Etanol e Derivados’ – BioTGA, 2012.

2.3 Resíduos do processamento

Um resíduo não é, por princípio, algo nocivo, muitos resíduos podem ser transformados em subprodutos ou em matérias-primas para outras linhas de produção (CEREDA, 2001).

A manipulação correta de um resíduo tem grande importância para o controle do risco que ele representa, pois um resíduo relativamente inofensivo, em mãos inexperientes, pode transformar-se num risco ambiental bem mais grave (BASTOS, 2007).

O Brasil é um dos países que mais produzem resíduos agroindustriais, devido a sua grande atividade agrícola. Produtores e indústrias da área enfrentam o problema de descarte dos resíduos gerados, que embora sejam biodegradáveis, necessitam de um tempo mínimo para serem mineralizados constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CAMPOS, 2005).

Durante a fabricação do álcool, além do produto desejado, aparecem certos produtos secundários, resultado do processo químico e tecnológico, que dificilmente podem ser evitados, a fim de diminuir a desvantagem deste fato, procura-se sempre uma utilidade para estes produtos compensando a inconveniência. (RASOVSKY, 1973).

Um dos grandes desafios das usinas produtoras de etanol a partir de cana-de-açúcar é reduzir a quantidade dos subprodutos (bagaço e vinhaça) gerados durante a fabricação de etanol. Algumas destilarias utilizam o bagaço como combustível durante o processo produtivo, também é realizada a fermentação contínua, reduzindo a quantidade de vinhaça em até 75% (BASTOS, 2007).

O aproveitamento mais racional de subprodutos poderá favorecer ainda mais o balanço energético. A disposição no ambiente de resíduos gerados em diversas atividades industriais tem resultado em frequentes relatos de problemas de poluição ambiental. Tais problemas levaram as autoridades a elaborar medidas efetivas para minimizar a poluição. Entre essas medidas, podem ser citadas as reduções da quantidade de resíduo geradas, utilização de tecnologias que permitam gerar resíduos menos poluentes, tratamento adequado dos resíduos antes da disposição no ambiente e aproveitamento dos resíduos em outras atividades (CEREDA, 2001).

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do seu aproveitamento tem sido muito incentivadas, já que podem contribuir para a

redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica desses resíduos tornando-o um subproduto e deste modo agregando valor ao processo de agro-industrialização (CAMILI, 2006).

Reduzir custo e o impacto dos resíduos no ambiente deve ser a estratégia a ser intensificada no aproveitamento de materiais. No custo final do processo é fundamental incluir ações que contemplem novos usos, dentro deste contexto, os resíduos deveriam ser vistos e remunerados como subprodutos reduzindo assim o impacto do preço da matéria prima no custo total do produto principal (CAMILI, 2006).

Em virtude da preocupação com a ecologia, no sentido de preservar o meio ambiente contra o despejo de resíduos poluidores, passou-se a motivar o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, constituídos principalmente de carboidratos polimerizados. A energia da planta que permanece após a fermentação e destilação do etanol é de interesse para o mercado de alimentação animal (MENEZES, 1980).

De forma geral os principais resíduos da fabricação de etanol a partir de materiais vegetais podem ser agrupados em líquidos e sólidos, os produtos gerados, e o volume dos mesmos, dependem em parte da matéria-prima utilizada (SALLAS, 2008).

O principal efluente da destilação de álcool é a vinhaça, a qual apresenta elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), por ser rica em matéria orgânica, caracterizando-se como uma fonte poluente quando descartada diretamente na água. Em função da carga orgânica presente na vinhaça ela tem sido usada como alternativa parcial para substituição da adubação mineral em lavouras, principalmente de cana (CRISPIM, 2000; LEONEL *et al.*, 1999).

Apesar de ter consistência líquida, pela NBR 10.004 da ABNT (2004) a vinhaça é considerada um resíduo sólido, pois não há solução técnica e econômica para o tratamento convencional eficiente que permita seu lançamento nos cursos d'água, dentro dos padrões exigidos pela legislação (SONEGO, 2012).

Na busca por alternativas para minimizar os efeitos ambientais, várias medidas estão sendo utilizadas para dar destino aos resíduos da produção de etanol entre elas estão: No caso do álcool a partir de cana pode-se utilizar o vinhoto gerado no processo para adubação devido ao seu alto teor de potássio, fósforo e nitrogênio. Há diversos tipos de aproveitamento do vinhoto para este fim: utilização direta o estado natural, utilização em estado purificado, utilização em forma de

concentrado, resultado da evaporação e utilização de vinhoto calcinado (RASOVSKY, 1973); Vinhaças foram usadas como fertilizante agrícola (VIEITES, 1998), herbicida (FIORETTO, 1985), inseticida (PONTE et al., 1992), nematicida (PONTE; FRANCO, 1981) e substrato para o crescimento de micro-organismos (WOSIACKI, 1994).

O uso de substâncias estimulantes, a partir de resíduos, tem mostrado um grande potencial para aumentar a produtividade agrícola, no entanto sua utilização ainda não é uma prática rotineira em culturas que não atingiram um alto nível tecnológico (CASTRO, 2008).

Os Materiais lignocelulósicos como talos e bagaços, correspondem às partes estruturais da planta, geralmente utilizados para recuperação de energia com cogeração, especificamente para atender às necessidades de energia da fase de destilação do etanol, embora possa ser vendido o excedente (MENEZES, 1980).

Quando produzido etanol a partir de mandioca, aproximadamente 24% dos açúcares redutores obtidos na hidrólise ficam retidos no resíduo fibroso após a prensagem, foram encontrados valores de inclusão de até 15% em rações para frango de corte em fase início (0 a 20 dias) substituindo parcialmente a fonte energética, (no caso milho), não se apresentaram diferenças significativas no desempenho dos animais quando comparados com uma testemunha comercial (CAMACHO, 2009).

Resíduos resultantes dos processos de hidrólise-sacarificação de mandioca apresentaram boas características, para aplicação como base de produtos dietéticos ricos em fibras insolúveis. O uso da pectinase como enzima complementar gera um resíduo fibroso, com boas qualidades nutricionais e o aproveitamento desse resíduo poderia, sem dúvida, colaborar para a viabilização econômica do uso desta enzima como complementar no processo (LEONEL, 1999).

Pesquisas feitas com resíduos sólidos da produção de etanol a partir de milho usados na alimentação de suínos mostraram que a inclusão de 10% de resíduos sólidos da produção de etanol a partir de milho em dietas para suínos em terminação não afetam o desempenho e parâmetros de carcaça, além de contribuir para o melhor custo de formulação (STEIN et al. 2009).

A maior demanda de alimentos para animais é satisfeita numa alta proporção com grãos e diversas fontes proteicas, os países em desenvolvimento não contam com suficientes recursos de produção para satisfazer a demanda e tem que recorrer a importações cada vez maiores que afetam desfavoravelmente as economias. Por outra parte os grãos continuam sendo vitais para a alimentação humana no terceiro

mundo, o que origina uma competência na produção para o consumo humano e o consumo na alimentação animal. Todo o anterior indica a conveniência na busca de alternativas para satisfazer as necessidades alimentícias (BUITRAGO, 1990).

As limitações para a transformação dos resíduos em produtos para alimentação animal estão ligadas à deficiência e/ou a desequilíbrios nas características nutricionais do resíduo e aos custos com a coleta, o transporte e, geralmente, com o tratamento necessário para melhoria de seu valor nutritivo (BUITRAGO, 1990).

Com resíduos aquosos estas limitações são severas, pois o baixo teor de matéria seca pode comprometer o rendimento industrial do produto e impacta diretamente nos custos de armazenamento e transporte. Por isso, muitas vezes a destinação dada a este resíduo restringe-se a utilização pela própria fonte geradora em suas atividades agrícolas e pecuária ou por agricultores e pecuaristas situados próximos aos locais de produção (RODRIGUES & RODRIGUES, 2012).

Quando um material sofre alteração em suas propriedades originais durante o período de armazenamento sua possibilidade de uso fica bastante reduzida, pois não há garantia de qualidade e conseqüentemente aumento de riscos e malefícios relativos à sua destinação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2012).

BELYEA et al., (1989) e GRASSER et al., (1995) consideraram que a inclusão dos subprodutos da agroindústria na alimentação animal é uma alternativa a ser considerada para minimizar os impactos ambientais e também ser economicamente justificável devido ao preço competitivo desses subprodutos em relação a alimentos concentrados convencionalmente usados na formulação de rações.

A ideia da utilização de alimentos não convencionais para animais ganha importância, principalmente com o objetivo de atender às dificuldades de pequenos produtores, para os quais muitas vezes o custo de alimentação dos animais é um impedimento para a criação em condições satisfatórias (RIBEIRO et al., 2007).

A possibilidade de uso dos resíduos e a agregação de valor as suas respectivas cadeias produtivas, pode ser um fator determinante para a viabilidade econômica da atividade. Portanto, aspectos como quantidade de resíduo gerado, composição, técnicas de armazenamento, transporte e estabilidade durante o armazenamento devem ser estudadas para orientar a aplicabilidade e desenvolvimento de processos tecnológicos para a destinação adequada do mesmo (RODRIGUES & RODRIGUES, 2012).

2.4. Experimentação Animal

Pinturas de agrupamentos neolíticos, assim como pequenas esculturas encontradas na Ásia e na Europa, e até mesmo restos de ossos em ruínas Incas, revelam deformidades que permitem fazer certos diagnósticos e mostram intervenções cirúrgicas terapêuticas. A observação de fenômenos biológicos e as tentativas de cura provavelmente devem ter ocorrido desde os agrupamentos homínídeos primitivos. Entretanto, só a invenção da escrita possibilitou um maior conhecimento sobre as descobertas dos povos antigos em relação aos fenômenos do organismo saudável ou enfermo (LAPCHICK et al., 2009).

As primeiras menções escritas feitas a doenças e seus tratamentos encontrasse nos famosos papiros de Ebers e de Smith. O primeiro descreve numerosas medidas terapêuticas, o segundo, contém a primeira citação ao sistema nervoso (MATTARAIA, 2007).

Aristóteles, no século 2 a.C., estudou a anatomia de diversos animais, Herófilo durante o período alexandrino, dissecava rotineiramente animais, chegando à errônea conclusão de que as artérias só continham ar, pelo fato de realizar seus estudos em animais mortos. Galeno, no século 2 d.C., dissecou centenas de animais de várias espécies e extrapolou suas descobertas para o homem, sem aparentemente jamais ter dissecado cadáveres humanos (TIMO-IARIA, 1992)

Durante os séculos 18 e 19 a experimentação animal progrediu lentamente de uma prática relativamente incomum, até alcançar um enfoque científico. À medida que os conhecimentos científicos avançaram, as metodologias também se modificaram, adaptando-se aos novos desafios. É absolutamente lícito, do ponto de vista de metodologia científica, fazer uso de determinadas espécies para o estudo de fenômenos biológicos e transferir os resultados obtidos para outras espécies, inclusive para espécie humana (MATTARAIA, 2007).

No Brasil, os comitês de Ética começaram a ser constituídos na década de 1990, para avaliar condições nas quais os animais são submetidos à pesquisa, os comitês surgiram a partir do interesse das instituições de pesquisa e universidades. O uso de animais de laboratório para fins científicos e didáticos está embasado na Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que entrou em vigor na data de sua publicação (LAPCHICK et al., 2009)

2.4.1 Condições ambientais

Alguns fatores ambientais devem ser controlados para que os animais se sintam confortáveis e devem ser mantidos constantes para evitar que sofram o desgaste de adaptar-se fisiologicamente a estas variações.

Ratos e camundongos não desenvolvem mecanismos termorreguladores antes de 3-4 semanas e isto é muito importante, pois nesses animais leva alguns dias para que o pelo cresça. Não se dão bem em altas temperaturas, uma vez que não suam. Para manter a temperatura, eles produzem ou perdem calor, o que acarreta grande dispêndio de energia e esta demanda de adaptação pode extrapolar a capacidade metabólica do animal (LAPCHICK et al., 2009).

Uma diminuição da temperatura ambiente abaixo da capacidade do organismo para regular a temperatura do corpo aumenta a suscetibilidade dos animais a infecções (POOLE, 1999). A temperatura ambiente para roedores ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), para coelhos ($18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e para suínos adultos ($16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) deve ser mantida dentro dos limites (HEINE, 1998).

As condições climáticas dentro de uma sala de experimentação devem ser controladas por ajustes automáticos do equipamento de condicionamento, variações na temperatura ambiente influenciam os processos metabólicos. Animais em estresse térmico alteram a ingestão de alimentos, de água, o peso, a frequência respiratória e a produção. O estresse térmico também ocasiona alterações de comportamento que podem levar a erros de avaliação nas pesquisas (LAPCHICK et al., 2009).

O biotério de experimentação deve ter um ambiente padronizado no que se refere à temperatura, umidade, iluminação, qualidade do ar, através de filtração eficiente, e 10-15 trocas de ar por hora, de modo a não permitir a recirculação (POOLE, 1999).

O fator umidade é relevante na manutenção da termorregulação e na transmissão de doenças, algumas linhagens são mais suscetíveis que outras. A baixa umidade relativa aumenta a atividade dos animais (LAPCHICK et al., 2009).

A água conduz melhor o calor que o ar. A condutividade do calor pelo ar aumenta com o conteúdo de vapor presente. Variações de temperatura e umidade ambientais podem levar a alterações patológicas nas vias respiratórias, alterações na pele e infecções. Nos ratos, umidade relativa abaixo de 40% desencadeia o quadro de *ring disease*, constrições na cauda, restringindo a circulação sanguínea, a parte distal

torna-se edematosa podendo necrosar. A umidade recomendada nas salas deve ficar em torno de $45\% \pm 15\%$ (HEINE, 1998).

A luz estimula, via nervo óptico, o sistema hipotálamo-pituitário, levando à produção e secreção de hormônios necessários ao processo regulatório do organismo. Contribui também para a regulação do relógio interno, influenciado pela rotação da Terra. Inúmeras funções corporais e atividades do organismo ocorrem de forma cronologicamente dependente, isto é, em ritmo circadiano. Muitos resultados experimentais são influenciados pelos ritmos circadianos (HEINE, 1998).

A falta de ventilação adequada, aliada à alta densidade demográfica e à falta de higienização das gaiolas, leva ao aumento das concentrações de amônia no ar respirado causando irritação no epitélio de revestimento das vias aéreas superiores e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Também o aumento da concentração de dióxido de carbono superior a 8% resulta em inconsciência e morte (POOLE, 1999).

2.4.2. Rato

O rato de laboratório, ou rato *Norway*, é a forma domesticada da espécie *Rattus norvegicus*. Embora o gênero *Rattus* possua cerca de 300 espécies, a outra espécie mais conhecida é *Rattus rattus*, ou rato preto. O gênero pertence à ordem *Rodentia* e à Família *Muridae* (LAPCHICK *et al.*, 2009).

No século 21, o papel do rato se transformou de carregador de doenças infecciosas em ferramenta indispensável na medicina experimental e desenvolvimento de drogas. Exemplos atuais do uso do rato na pesquisa médica humana incluem: cirurgia, transplante, diabetes, distúrbios psiquiátricos incluindo intervenção comportamental e vício, regeneração neural, cura de ferimentos e de ossos, enjoo espacial, e doenças cardiovasculares. No desenvolvimento de drogas o rato é usado normalmente para demonstrar eficácia terapêutica e para descobrir atoxicidade de compostos terapêuticos antes dos testes clínicos em humanos (MATTARAIA, 2007).

Diversas características tornaram o rato um modelo atraente para pesquisa, entre elas seu pequeno porte, ciclo biológico curto e baixo custo de manutenção. A similaridade genética entre este roedor e os seres humanos é aproximadamente 80% (DESSEN, 2009).

O rato é um mamífero roedor, nasce sem pelos, de olhos fechados, com o conduto auditivo fechado, sem dentes, pesando em média cinco gramas, corpo

fusiforme, cauda longa, ausência de glândulas sudoríparas, receptores táteis bem desenvolvidos (cabeça, vibrissas, patas e cauda) e cinco dedos em cada pata. Apresenta longas vibrissas, aproximadamente quinze de cada lado, implantadas em profundidade e solidárias, com receptores mecânicos, constituindo um dos principais sentidos do rato. São animais de hábito noturno. Durante as duas primeiras semanas de vida do filhote, o sistema nervoso está em processo de maturação (SANTOS, 2010).

O instituto Wistar, fundado em 1982, é o mais antigo instituto de pesquisa nos Estados Unidos, e foi o local onde estabeleceram ratos de laboratório como um importante animal. Henry Donaldson e seu grupo trabalharam para padronizar o rato albino, a fim de se realizar estudos reprodutíveis sobre o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso. O instituto Wistar forneceu o “rato Wistar” para outros laboratórios até 1960, quando as matrizes reprodutoras e todos os direitos foram vendidos a uma empresa comercial (LAPCHICK *et al.*, 2009).

A linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório e sua importância deve-se ao fato de o Dr. Donaldson e sua equipe terem realizado inúmeras pesquisas para obter dados fundamentais, principalmente curvas de crescimento do animal, do crânio, do esqueleto e de vários órgãos individualmente (LAPCHICK *et al.*, 2009).



Figura 7. Rato Wistar.

Como apresentado na Figura 7, os ratos Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. Ratos Wistar são considerados animais dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado (SANTOS, 2010).

A ontogenia do rato Wistar ocorre aproximadamente da seguinte forma: Abertura do pavilhão auditivo de 2 a 4 dias de vida, a penugem aparece por

volta de 5 a 6 dias e têm o corpo coberto de pelos aproximadamente aos 9 dias de vida, erupção dos incisivos superiores de 6 a 12 dias de vida, abertura do conduto auditivo e dos olhos de 10 a 14 dias de vida, ingestão de alimentos sólidos de 11 a 13 dias de vida, a puberdade ocorre por volta de 45 a 55 dias de vida, a expectativa de vida em biotério é de 24 a 36 meses (LEVINE, 2001).

Uma característica peculiar dos roedores, incluindo os ratos, é a ausência dos caninos e a presença de incisivos bem desenvolvidos. Os ratos são monofiodonticos, significando que têm uma só dentição. O esmalte dos incisivos dos roedores contém ferro, que confere a dureza e lhes dá uma coloração amarelada. Esses incisivos crescem durante toda a vida e devem ser gastos, com isso os ratos têm o hábito de roer (LAPCHICK et al., 2009).

O rato não possui amídalas, tampouco receptores para o paladar da água. O esôfago do rato é inteiramente coberto com epitélio queratinizado. O estômago contém uma porção glandular e outra não glandular, separadas por um sulco limitante. O esôfago entra pela menor curvatura do estômago através de uma prega do sulco limitante e esta característica anatômica impede que o rato vomite, o que o torna um animal seletivo quanto à alimentação (LAPCHICK et al., 2009).

O intestino delgado do rato é composto pelo duodeno (10 cm), jejuno (100 cm) e íleo (3 cm). O ceco proeminente ocupa grande parte de cavidade abdominal. O rato possui um fígado com quatro lobos e não possui vesícula biliar. O pâncreas é um órgão difuso, que se estende da alça duodenal para o epíplon gastrointestinal. Pode ser diferenciado do tecido adiposo por sua maior consistência (LAPCHICK et al., 2009).

Os pulmões dos ratos são imaturos no nascimento e desprovidos de alvéolos, dutos alveolares e bronquíolos respiratórios. O remodelamento ocorre de quatro a sete dias após o nascimento, com o surgimento dos bronquíolos respiratórios aos dez dias após o nascimento (LAPCHICK et al., 2009).

As glândulas lacrimais (Harderian), localizadas atrás de cada olho, secretam porfirina (avermelhada), que pode ser observada nos cantos dos olhos ou na parte externa das narinas quando o rato está doente ou estressado. As patas dianteiras podem também ficar manchadas quando o animal tenta se limpar. Essas secreções podem ser confundidas com sangue, mas a porfirina fluoresce sob a luz ultravioleta diferente do sangue (LAPCHICK et al., 2009).

Os ratos como outros roedores, não possuem muitos mecanismos

fisiológicos para evitar o calor. Eles não suam, não possuem glândulas sudoríparas; o calor é dissipado através da vasodilatação na cauda e um aumento da salivação de água quando a temperatura aumenta. A taxa respiratória é aumentada para regular a temperatura do corpo (LAPCHICK et al., 2009). A Tabela 3 ilustra os parâmetros fisiológicos de ratos.

Tabela 3. Parâmetros Fisiológicos de ratos.

Expectativa de vida	2,5 a 3,5 anos
Temperatura corporal	36 – 37,5 °C
Peso do macho adulto	400-500 g
Peso da fêmea adulta	250-300 g
Produção de urina (24 horas)	5-6 mL
Produção de fezes (24 horas)	10-15 g
pH da urina	7,3 – 8,5

Fonte: LAPCHICK *et al.*, 2009

2.4.2.1 Requerimentos Nutricionais

O valor energético das dietas é função de sua digestibilidade e energia química e é geralmente descrito em termos de energia metabolizável (ME), medida biologicamente. A ME dos carboidratos é 17 kJ/g e das gorduras, 38 kJ/g. Os aminoácidos produzem aproximadamente a mesma quantidade de ME que o carboidrato, mas como as proteínas são os mais caros ingredientes de uma dieta, seu uso especificamente como fonte de energia torna-se economicamente inviável. Animais em rápido crescimento devem consumir alimento suficiente para fornecer cerca de quatro vezes mais energia do que a necessidade para o metabolismo basal, e varia com a idade entre espécies (LAPCHICK et al., 2009).

Proteínas são moléculas de estrutura complexa que constituem 50% do peso celular e têm importantes funções na manutenção dos fenômenos vitais, na formação do tecido, da musculatura e para as reações bioquímicas do organismo. A qualidade nutricional das proteínas é determinada pelo tipo e pela quantidade dos seus aminoácidos constituintes (LAPCHICK et al., 2009).

Gordura da dieta fornece ácidos graxos essenciais (AGE) que são

requeridos para síntese de lipídeos no tecido das membranas celulares. As gorduras são também uma fonte significativa de calorias (9cal/g), melhoram a palatabilidade dos alimentos e são necessárias para absorção normal e utilização de vitaminas lipossolúveis. Os animais estocam lipídeos nas células do tecido adiposo (LAPCHIK et al., 2009).

As vitaminas são compostos químicos puros requeridos em pequenas quantidades para o crescimento, manutenção, reprodução e lactação. São componentes de certas enzimas e sistemas hormonais essenciais para os processos normais da vida. São classificados com base na sua solubilidade como lipossolúveis, que se dissolvem em gorduras (K, A, D, E) e hidrossolúveis, que se dissolvem em água (complexo B, C e Biotina) (LAPCHIK et al., 2009).

Os minerais têm uma gama de funções, como funções estruturais do cálcio e fósforo no osso, de efeitos osmóticos e iônicos de sódio e potássio, e como parte integral de enzima (LAPCHIK et al., 2009).

O animal esta constantemente perdendo água na urina, transpiração e expiração. A água é uma importante substância, não sendo um nutriente, mas vital no ambiente interno do animal para mover substâncias pelo organismo e para permitir a maioria das reações bioquímicas que ocorrem no organismo e que são processos da vida. A necessidade vital de água deve ser satisfeita. Os animais de laboratório devem ter acesso *ad libitum* a água fresca, potável e não contaminada (LAPCHIK et al., 2009).

2.4.2.2 Eutanásia

O termo Eutanásia vem do grego, *eutanásia*, que vem sendo entendida, desde a antiguidade, em seu sentido literal: “boa morte” (com bondade, com benevolência, felizmente). O termo foi proposto por Francis Bacon, em 1693, em sua obra *Historia vitae et mortis*, como sendo o “tratamento adequado às doenças incuráveis”. Existem dois tipos de métodos aceitáveis de eutanásia, os físicos onde se encontram: concussão, deslocamento cervical, decapitação e irradiação por micro-ondas e os químicos onde se encontram anestésicos, agentes inalatórios e dióxido de carbono. Em concentrações superiores a 60%, o dióxido de carbono age como um agente anestésico e causa rápida perda de consciência, devido ao efeito narcótico da ingestão elevada sobre o cérebro, provocando hipóxia (LAPCHIK et al., 2009).

2.4.3. Análises Laboratoriais

2.4.3.1 Histologia

A histologia (do grego: *hydton* = tecido + *logos* = estudos) é a ciência que estuda os tecidos biológicos, sua formação (origem), estrutura (tipos diferenciados de células) e funcionamento. A técnica histológica visa à preparação dos tecidos destinados ao estudo à microscopia de luz. O exame ao microscópio é feito geralmente por luz transmitida, o que significa que a luz deve atravessar o objeto a ser examinado. Assim, é necessária a obtenção de fragmentos dos tecidos que serão coletados em lâminas muito finas e transparentes (CAPUTO, 2008).

Os passos para a obtenção de um preparado histológico permanente, denominado lâmina histológica resumidamente são: A colheita do material ou obtenção da peça, por biópsia ou necropsia (GRIMALDI FILHO, 1981).

A fixação que visa impedir a destruição das células por suas próprias enzimas (autólise), ou bactérias. Este tratamento é feito imediatamente após a retirada do material (biópsia), ou até antes (fixação por perfusão do animal). A fixação visa ainda endurecer os tecidos, tornando-os mais resistentes e favoráveis às etapas subsequentes da técnica histológica. A fixação pode ser feita por processos físicos ou químicos. A fixação química, mais usada em Histologia, é feita por fixadores que podem ser simples ou compostos. Como exemplo de fixador simples temos o formol e, de composto, um exemplo é o líquido de Bouin (uma mistura de formol, ácido pícrico e ácido acético) (GRIMALDI FILHO, 1981).

A desidratação que visa retirar a água dos tecidos, a fim de permitir a impregnação da peça com parafina. Para isto, a peça é submetida a banhos sucessivos em alcoóis de teor crescente (ex.: álcool a 70%, 80%, 90% e 100%) (GRIMALDI FILHO, 1981).

A impregnação pela parafina fundida com a finalidade de permitir a obtenção de cortes suficientemente finos para serem observados ao microscópio. Para isso os tecidos devem ser submetidos a banhos de parafina a 60°C, no interior da estufa. Em estado líquido, a parafina penetra nos tecidos, dando-lhes, depois de solidificada, certa dureza (GRIMALDI FILHO, 1981).

A Inclusão, é a passagem da peça que estava na estufa para um recipiente retangular (forma) contendo parafina fundida que, depois de solidificada à temperatura ambiente, dá origem ao chamado “bloco de parafina”. A Microtomia é a etapa em que se obtêm delgadas fatias de peças incluídas na parafina, através de um

aparelho chamado micrótomo, que possui navalha de aço. A espessura dos cortes geralmente varia de 5 a 10 µm (micrômetros) (GRIMALDI FILHO, 1981).

Na Extensão, os cortes provenientes da microtomia são “enrugados”. Para desfazer estas rugas, são esticados num banho de água e gelatina a 58°C, e “pescados” com uma lâmina. Leva-se então, à estufa a 37°C, por 2 horas, para que se dê a colagem do corte à lâmina, pela coagulação da gelatina contida na água quente (GRIMALDI FILHO, 1981).

A Coloração tem a finalidade de dar contraste aos componentes dos tecidos, tornando-os visíveis e destacados uns dos outros. Para realizá-la, são observados três itens:

- a) Eliminação da parafina - por meio de banhos sucessivos em xilol, benzol ou toluol.
- b) Hidratação - é executada quando o corante utilizado é solúvel em água. Deve ser gradativa, com alcoóis de teor decrescente, para evitar o rompimento dos tecidos.
- c) Coloração - os corantes são compostos químicos com determinados radicais ácidos ou básicos que possuem cor, e apresentam afinidade de combinação com estruturas básicas ou ácidas dos tecidos (GRIMALDI FILHO, 1981).

Rotineiramente, usa-se hematoxilina, corante básico, que se liga aos radicais ácidos dos tecidos, e eosina, corante ácido que tem afinidade por radicais básicos dos tecidos. Os componentes que se combinam com corantes ácidos são chamados acidófilos e os componentes que se combinam com corantes básicos são chamados basófilos (GRIMALDI FILHO, 1981).

A desidratação visa retirar a água, quando os corantes utilizados forem soluções aquosas, a fim de permitir perfeita visualização dos tecidos, pois a água possui índice de refração diferente do vidro, e ainda prevenir a difusão dos corantes. Para isto usam-se banhos em alcoóis de teor crescente (GRIMALDI FILHO, 1981).

A diafanização é feita com xilol, a fim de tornar os cortes perfeitamente transparentes para posteriormente fazer a montagem que é a etapa final da técnica histológica, e consiste na colagem da lamínula sobre o corte, com bálsamo do Canadá, que é solúvel em xilol e insolúvel em água. A lamínula impede que haja hidratação do corte pela umidade do ar ambiente, permitindo então que estas lâminas se mantenham estáveis por tempo indefinido. Após a montagem, levam-se as lâminas à estufa, para secagem do bálsamo do Canadá (GRIMALDI FILHO, 1981).

2.4.3.2 Perfil Sanguíneo

A composição bioquímica do plasma sanguíneo reflete de modo fiel a situação metabólica dos tecidos animais, de forma a poder avaliar lesões teciduais, transtornos no funcionamento de órgãos, adaptação do animal diante de desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrios metabólicos específicos ou de origem nutricional (NYBLOM. et al., 2006)

As enzimas são catalisadores proteicos responsáveis pela maioria das reações químicas do organismo, encontradas em todos os tecidos, muitos processos patológicos ocasionam alterações na permeabilidade das membranas ou mesmo morte celular, resultando na liberação de enzimas intracelulares no plasma. Estas enzimas são depuradas no plasma a velocidades variáveis que dependem da estabilidade da enzima e de sua captação pelo sistema retículo endotelial. Poucas são as enzimas específicas de um tecido ou órgão, porém, a proporção entre as diferentes enzimas varia de tecido para tecido. Este fato, combinado com o estudo da cinética de aparecimento e desaparecimento de enzimas particulares no plasma, permite que o diagnóstico de uma patologia específica possa ser estabelecido (MINICIS, 2007).

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Na célula hepática, a ALT localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da ALT (NYBLOM. et al., 2006).

Em geral, as causas mais comuns de elevação dos valores de ALT no sangue ocorrem por disfunção hepática. Desta maneira, a ALT além de ser sensível é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular; uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos também provoca uma maior liberação de ALT para a corrente sanguínea, elevando seus níveis séricos (NYBLOM. et al., 2006)

A relação AST/ALT (Índice DeRitis) tem sido empregada algumas vezes para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias. Na hepatite virótica aguda, a relação AST/ALT é sempre menor que 1, enquanto que nas outras doenças hepatocelulares (cirrose, hepatites crônicas, etc) é sempre > 1 . Os valores elevados de ALT são mais comumente verificados nas seguintes patologias: hepatites, cirrose, necrose hepática, colestase, isquemia hepática, tumor hepático, drogas hepatotóxicas,

icterícia obstrutiva, miosite e pancreatite (KOOMAN, 2009).

A função renal pode ser avaliada indiretamente por alterações nas concentrações plasmáticas de ureia, que é quantitativamente o maior produto do metabolismo proteico, creatinina que é um produto da quebra de creatina e fosfocreatina e ácidos orgânicos nitrogenados envolvidos no metabolismo energético das células musculares esqueléticas (KOOMAN, 2009).

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não-protéico formado a partir da desidratação da creatina. A interconversão de fosfocreatina e creatina é uma característica particular do processo metabólico da contração muscular, uma parte da creatina livre no músculo não participa da reação e é convertida espontaneamente em creatinina. A creatinina avalia o ritmo de filtração glomerular, aumenta sua concentração no sangue à medida que reduz a taxa de filtração renal, em função desta característica é possível analisar este produto presente no sangue para identificar alterações (BURMEISTER, 2007)

O metabolismo de proteínas libera amônia que é convertida em ureia pelo fígado. Os glicocorticoides têm um efeito antianabólico e os hormônios tireoidianos têm uma ação catabólica sobre o metabolismo das proteínas. Portanto, ambos atuam aumentando a taxa de ureia sanguínea. Já os andrógenos e o hormônio do crescimento têm uma ação anabólica sobre o metabolismo proteico, diminuindo assim a síntese da ureia. A lesão renal provoca uma retenção de substâncias tóxicas como a ureia através de distúrbios da filtração, reabsorção, secreção e excreção. Na lesão hepática, haverá uma diminuição da conversão de amônia em ureia causando uma hiperamonemia. Mesmo a ureia não tendo boa especificidade para diagnosticar mudanças da função renal geral, ela é mais sensível a alterações primárias das condições renais, por isso é um marcador que tem forte importância em casos que envolvam esta condição (NYBLOM. et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A primeira parte do estudo adaptou metodologias para obtenção de álcool a partir de cinco matérias-primas amiláceas: Mandioca, milho, arroz, batata doce e sorgo em uma planta piloto de produção de bioetanol.

Foram produzidos resíduos sólidos formando amostras separadas, uma para cada matéria-prima empregada. Posteriormente estes resíduos foram caracterizados físico-quimicamente.

Foram formuladas rações para ratos Wistar com inclusões de 10% dos resíduos caracterizados e as rações foram fabricadas e oferecidas a animais que permaneceram por 21 dias alimentados a base destas formulações.

Os experimentos da fase de produção dos resíduos e as análises laboratoriais foram realizados nos laboratórios do Centro de Raízes e Amidos Tropicais CERAT/UNESP. A fabricação das rações e a avaliação biológica com os animais foram realizadas no Biotério da Patologia nas instalações da FMB/UNESP Botucatu.

3.1 Matéria-Prima:

As matérias-primas utilizadas para a produção de etanol foram:

- Raízes de mandioca variedade Fécula Branca coletadas no Campo Experimental do CERAT/UNESP em Botucatu.
- Sorgo obtido no comercio de Botucatu - SP
- Quirera de arroz obtida no comercio de Botucatu - SP
- Milho em forma de fubá, da Yoki Alimentos S.A.
- Batata doce obtida no comercio de Botucatu - SP

As análises centesimais das amostras de mandioca, sorgo, arroz, milho e batata doce foram feitas seguindo a metodologia da AOAC (1990), SOMOGY, (1945) e NELSON (1944). As análises foram realizadas em triplicatas para cada amostra.

3.2 Processamento

A Figura 9 apresenta o fluxograma para obtenção dos resíduos sólidos estudados.

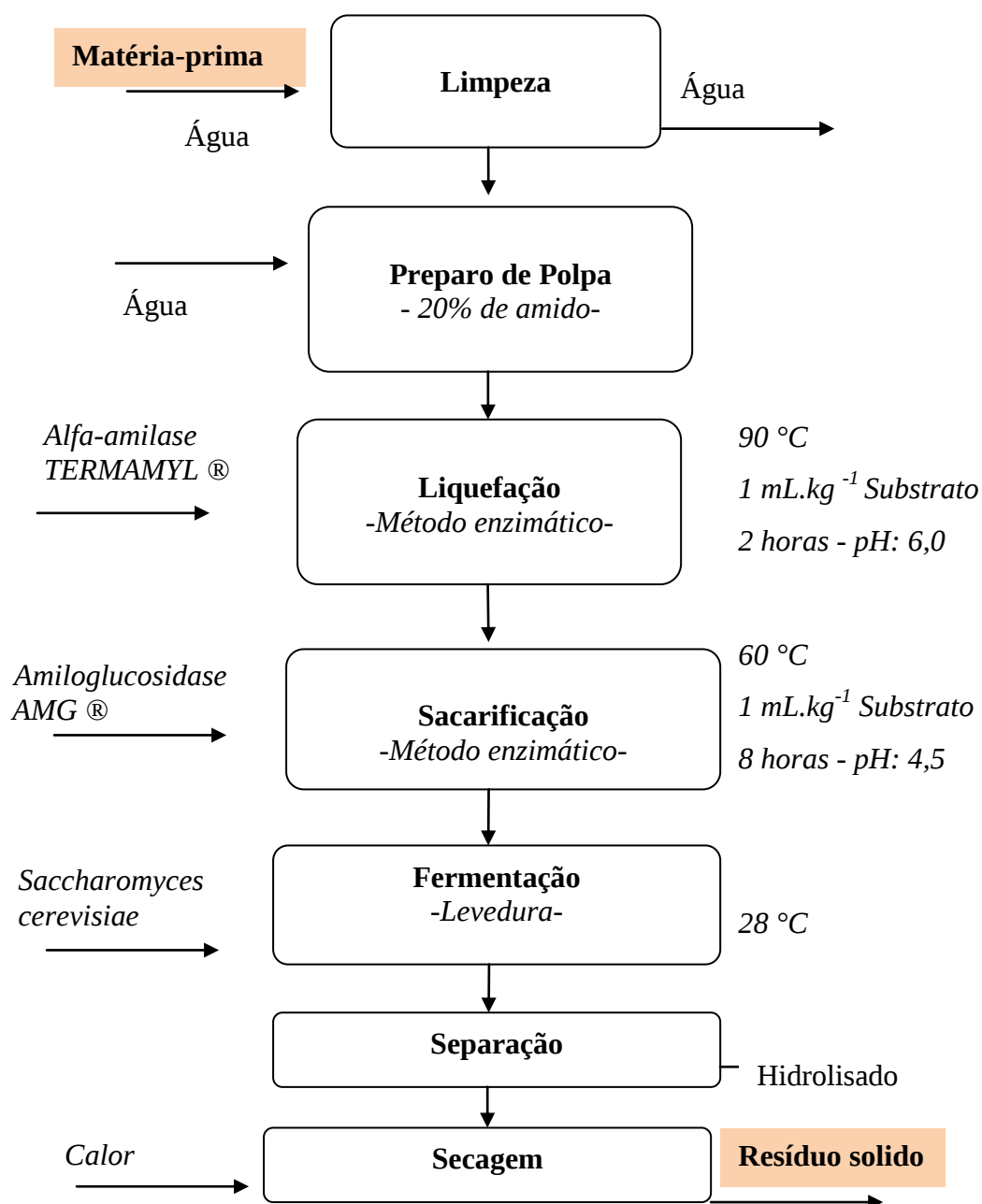


Figura 9. Fluxograma para produção dos resíduos sólidos de matérias-primas

amiláceas na produção de álcool.

Cada matéria-prima foi processada separadamente seguindo o processamento ilustrado na Figura 9. Quantitativamente a preparação das polpas foram:

Mandioca: As raízes foram lavadas com água potável para retirar terra e outras impurezas provenientes do campo, posteriormente foram trituradas e misturadas com água até formar uma polpa homogênea com 20% de amido, para isto foram usados 3840 g de raízes e 8160 g de água destilada.

Sorgo: Os grãos foram lavados com água potável para retirar terra e outras impurezas provenientes do campo, posteriormente foram moídos e misturados com água até formar uma polpa homogênea com 20% de amido, para isto foram usados 3300 g de grãos moídos e 8700 g de água destilada.

Arroz: Os grãos foram lavados com água potável para retirar terra e outras impurezas provenientes do campo, posteriormente foram moídos e misturados com água até formar uma polpa homogênea com 20% de amido, para isto foram usados 2480 g de grãos moídos e 9520 g de água destilada.

Milho: Foi utilizado em forma de fubá que foi misturado com água até formar uma polpa homogênea com 20% de amido, para isto foram usados 3140 g de fubá e 8860 g de água destilada.

Batata doce: Os tubérculos foram lavados com água potável para retirar terra e outras impurezas provenientes do campo, se formaram chips que depois de secos em estufa a 60 graus centígrados por dois dias foram triturados e misturados com água até formar uma polpa homogênea com 20% de amido, para isto foram usados 5280 g de farinha de batata-doce e 6720 g de água destilada.

Posterior à obtenção da polpa, deu início à liquefação, colocando a polpa em contato com enzima alfa-amilase, foi usada a enzima comercialmente conhecida como TERMAMYL® produzida pela empresa NOVOZYMES. A TERMAMYL® é usada na produção de etanol para quebrar o amido produzindo cadeias curtas, fragmentando polissacarídeos em cadeias menores, as dextrinas. Especificamente catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -D (1→4) e α -D (1→4). Foram seguidas as especificações do fabricante, onde a reação do meio foi mantida a pH

6,0; com temperatura de 90°C e com agitação constante de 100 RPM.min⁻¹.

Após duas horas, foi adicionada a enzima amiloglicosidase conhecida comercialmente como AMG®, produzida e comercializada pela empresa NOVOZYMES. Para dar início a esta etapa resfriou-se o meio a 60°C, baixou-se o pH a 4,5 com HCL (ácido clorídrico) e todo o conjunto foi mantido sob agitação constante de 100 RPM.min⁻¹ por 8 horas aproximadamente.

Depois de finalizada a etapa de hidrólise, iniciou-se a fermentação com o preparo do inóculo para multiplicar a levedura. Foram usadas aproximadamente 240 gramas da levedura desidratada *Sacharomyces cerevisiae*, cepa Y-904 fornecida pela empresa AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.

No mesmo reator agitado onde foi completado o processo de hidrólise foi adicionada água potável para fornecer á levedura um meio com 18% de ART. O pH foi ajustado para 4.5.

A levedura foi adicionada e o mosto foi fermentado por 24 horas até a observação da diminuição e/ou desaparecimento da produção de gás, indicando o término do processo fermentativo.

A temperatura inicial do mosto foi de 25 a 28°C, atingindo o valor máximo de 33°C ao final do processo fermentativo.

Finalizado o processo fermentativo a suspensão foi filtrada em tela filtrante de filtro a vácuo marca MF DIMAN-ME, onde o líquido foi separado da parte sólida (resíduos). Posteriormente os resíduos produzidos foram dispostos em bandejas plásticas e deixados em estufa com circulação de ar a 70°C por 48 horas.

Foram feitas análises centesimais para a caracterização físico-química dos resíduos seguindo a metodologia da AOAC (1990) e SOMOGY, (1945). As análises foram realizadas em triplicatas para cada amostra.

3.3. Experimentação Animal

Foram utilizados cinquenta e seis (56) ratos Wistar machos, com 21 dias de idade. Os ratos nasceram no Biotério Central da Administração Geral do Campus e foram mantidos no Biotério do Laboratório Experimental da Patologia/FMB.

No presente estudo, os animais foram distribuídos aleatoriamente

em sete grupos de oito animais. Cada grupo foi alimentado com um tipo de ração.

As rações usadas nos experimentos foram elaboradas com o Software SUPERCAC - Cálculo de ração de custo mínimo - TD Software. De acordo com ANDRIGUETO et al., 1990, as exigências da ração para rato são descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Requerimentos nutricionais de ratos Wistar.

Níveis e Garantia	
Umidade (max)	130,00 g.kg⁻¹
Proteína bruta (min)	230,00 g.kg⁻¹
Extrato etéreo (min)	40,00 g.kg⁻¹
Fibra bruta (max)	50,00 g.kg⁻¹
Minerais	
Cálcio (min)	12,00 g.kg ⁻¹
Cálcio (max)	13,00 g.kg ⁻¹
Fósforo (min)	8.500,00 mg.kg ⁻¹
Vitaminas	
A (min)	25500,00 UI.kg ⁻¹
D3 (min)	4000,00 UI.kg ⁻¹
E (min)	82,00 UI.kg ⁻¹
K3 (min)	6,40 mg.kg ⁻¹
Ácido fólico (min)	13,00 mg.kg ⁻¹
Biotina (min)	0,16 mg.kg ⁻¹
Colina (min)	1800,00 mg.kg ⁻¹
Niacina (min)	219,00 mg.kg ⁻¹
Ácido pantotênico (min)	90,00 mg.kg ⁻¹
B1 (min)	11,00 mg.kg ⁻¹
B6 (min)	11,00 mg.kg ⁻¹
B12 (min)	40,00 mg.kg ⁻¹
Sódio (min)	2700,00 mg.kg ⁻¹
Ferro (min)	180,00 mg.kg ⁻¹
Cobre (min)	30,00 mg.kg ⁻¹
Zinco (min)	110,00 mg.kg ⁻¹
Manganês (min)	110,00 mg.kg ⁻¹
Iodo (min)	1,00 mg.kg ⁻¹
Selênio (min)	0,20 mg.kg ⁻¹
Cobalto (min)	2,00 mg.kg ⁻¹
Magnésio (min)	500,00 mg.kg ⁻¹
Lisina (min)	12,50 mg.kg ⁻¹
Metionina (min)	3500,00 mg.kg ⁻¹

Fonte: ANDRIGUETO et al, 1990

As rações foram balanceadas com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais, DL metionina e os resíduos sólidos gerados no processo de fabricação de álcool. Estes foram incluídos separadamente utilizando-se 1 resíduo para cada tratamento individual nas formulações em 10% do total de cada, aportando principalmente energia as rações.

Foram produzidas 6 rações, sendo 5 com inclusão de resíduo e 1 testemunha, onde o resíduo foi substituído por fuba de milho. A Figura 9 ilustra as operações realizadas na fabricação das rações. Foi usada a ração comercial Prescence Ratos e Camundongos como testemunha comercial.

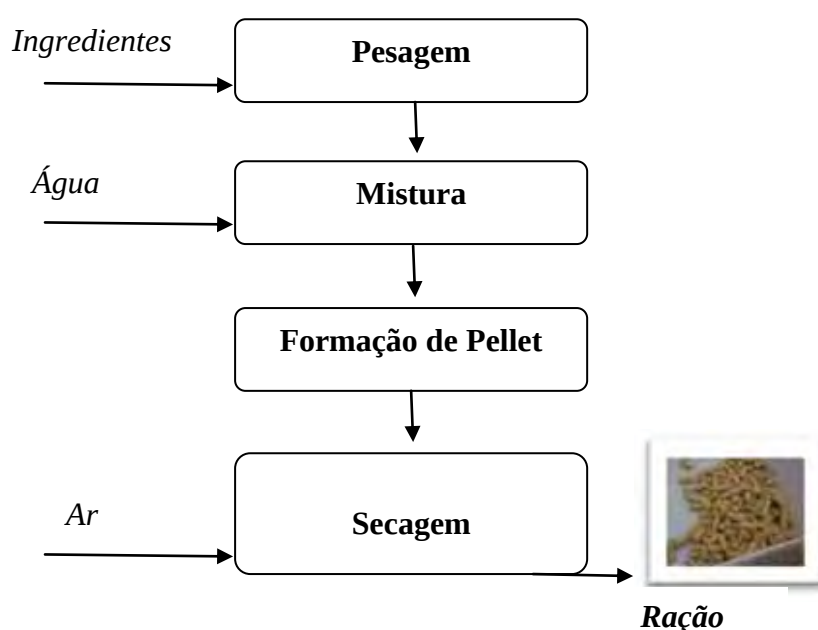


Figura 9. Operações para fabricação de rações.

Os equipamentos usados para a fabricação das rações foram: Misturador tipo paleta totalmente em aço inox, com capacidade para 10 quilos, peletizadora de disco e secador com fluxo de ar.

Cada formulação foi misturada por aproximadamente vinte minutos, foram adicionados até dois litros de água em cada formulação para facilitar a formação dos pellets na máquina peletizadora de disco, finalmente foram colocados (os pellets) na secadora com fluxo de ar por vinte quatro horas para eliminar a umidade resultante das operações anteriores. As rações foram armazenadas em sacos plásticos e guardadas em “freezer” imediatamente depois de retiradas do secador para sua melhor conservação.

Os ratos foram colocados em caixas de polipropileno com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha, sendo a troca da maravalha três vezes por semana. Cada caixa continha quatro animais e cada grupo duas caixas, totalizando oito ratos por grupo.

Como mostra a Tabela 5,

- o grupo 1 foi formado pelas caixas 1 e 2, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Testemunha onde a ração avaliada foi a que tinha inclusão de 10% de fubá de milho;
- o grupo 2 foi formado pelas caixas 3 e 4, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Mandioca onde a ração avaliada foi a que tinha inclusão de 10% de resíduos sólidos do processamento de mandioca;
- o grupo 3 foi formado pelas caixas 5 e 6, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Milho onde a ração avaliada foi a que tinha inclusão de 10% de resíduos sólidos do processamento de milho;
- o grupo 4 foi formado pelas caixas 7 e 8, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Batata-doce onde a ração avaliada foi a que tinha inclusão de 10% de resíduos sólidos do processamento de batata-doce;
- o grupo 5 foi formado pelas caixas 9 e 10, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Arroz onde a ração avaliada foi a que tinha inclusão de 10% de resíduos sólidos do processamento de arroz;
- o grupo 6 foi formado pelas caixas 11 e 12, abrigou 8 animais referentes ao grupo chamado Ração Comercial onde a ração avaliada foi a normalmente usada no biotério, no caso Presence Ratos e Camundongos.

Tabela 5. Distribuição dos animais no biotério.

GRUPO	CAIXA	TRATAMENTO
1	1 – 2	Testemunha
2	3 – 4	Mandioca
3	5 – 6	Milho
4	7 – 8	Batata-doce
5	9 -10	Sorgo
6	11 – 12	Arroz
7	13 – 14	Ração Comercial

Os animais foram adaptados ao biotério por um período de oito dias, onde receberam as rações formuladas e água a vontade sem ser efetuado o recolhimento de nenhum dado referente a consumo ou peso. Durante todo período do estudo, o biotério teve controle automático de luz e temperatura de 21°C.

Foram feitas marcações com ácido pícrico (amarelo) como mostra a Figura 10 na cauda, cabeça e pata dianteira para ajudar na identificação dos animais no posterior recolhimento dos dados; esta marcação foi mantida durante todo o experimento.



Figura 10. Marcação dos animais

Na avaliação do desempenho dos animais, coletaram-se os dados relativos à pesagem dos ratos, da ração e água ofertada nos tempos de 1, 3, 6, 8, 10, 13, 17, 20, 22, 24, 27, 29, 31, 34, 36, 38 e 41 dias. Através dos dados foram calculados o Consumo de Ração (CR), Ganho de Peso (GP) e a Conversão Alimentar (CA) para cada grupo. Esses índices foram utilizados para avaliar os efeitos da adição dos resíduos sobre o desempenho dos animais. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste Tukey a 5% de probabilidade, através do programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos ASSISTAT, 2012.

Todos os animais foram sacrificados quarenta e dois (42) dias depois do início do experimento. A eutanásia dos animais foi feita em câmara de dióxido de carbono - CO₂, onde foi injetada uma atmosfera com 70% de CO₂ no ar para a rápida perda de consciência, sem hipóxia. Os animais foram mantidos na câmara por 10 minutos, para confirmação de sua morte.

A morte foi confirmada pela ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. Posteriormente foram feitas a

sangria, evisceração, e congelamento antes do descarte dos cadáveres.

O sangue foi coletado em frascos devidamente identificados, e após repouso foram centrifugados a 3000 rpm por dez (10) minutos para se obter o soro de cada animal e realizar exames bioquímicos de ALT, AST (transaminases), creatinina e ureia.

Todas as amostras foram mantidas a -10° C até o momento da análise. Após a morte dos animais, os órgãos foram retirados e conservados por 24 horas em formol 10%, lavados em água corrente “over night” e transferidos para solução de álcool 70% para posterior processamento.

Os órgãos retirados para estudo foram:

- Estomago
- Fígado;
- Intestinos delgado;
- Intestino grosso;
- Rins direito e esquerdo

Foram preparados de modo a preservar sua estrutura original ao máximo possível. Os passos das técnicas histológicas foram: Fixação dos tecidos, desidratação, inclusão, microtomia, e coloração de lâminas. A fixação paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para os tratamentos posteriores. A fixação evitou a autólise celular, impedindo a proliferação de microrganismos, levou ao endurecimento do tecido para resistir aos tratamentos posteriores. Para inclusão foi usada a parafina histológica Histosec Pastilhas – MERK, os tecidos foram criteriosamente preparados para receber o meio de inclusão (parafina). E foram obtidos cortes delgados no processo de microtomia. Os cortes de tecidos apresentaram-se incolores após a microtomia. A coloração visou contrastar as estruturas teciduais. Foram usados os corantes Hematoxilina e Eosina.

As laminas foram analisadas em microscópio eletrônico com objetiva de 10x.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Matérias-primas

Antes do processamento cada matéria-prima estudada foi caracterizada físico e quimicamente, cujos valores das análises centesimais são apresentados na Tabela 6 .

Tabela 6. Composição centesimal das matérias-primas.

Matéria-prima /Análise	Mandioca Teores (% em base seca)	Batata-doce Teores (% em base seca)	Arroz Teores (% em base seca)	Sorgo Teores (% em base seca)	Milho Teores (% em base seca)
Umidade inicial (% base úmida)	62,50	63,80	8,30	10,72	9,50
Carboidratos	34,10	28,50	80,00	77,06	79,95
Matéria graxa	0,10	0,20	0,80	2,58	1,64
Proteína	0,60	1,20	7,56	5,48	5,97
Fibras	1,50	3,80	1,38	1,62	1,20
Cinzas	0,84	0,50	0,32	0,84	0,24
Acidez*	0,70	0,60	0,50	0,70	0,50

* mL de NaOH/100g

Observa-se que os teores encontrados podem ser comparados com resultados obtidos por Camili (2009), onde foram encontrados valores para mandioca de: Umidade 63,6%, proteína 0,06%, matéria graxa 0,08%, fibra 1,44%, cinzas 0,86%, açúcar total 2,72% e amido 31,18%. Capobiango (2006) encontrou valores para milho de: Umidade 11,04%, proteína 6,13%, matéria graxa 1,94%, fibra 5,86%, carboidratos 80,42%.Silva (2010) encontrou valores para batata-doce de: Umidade 59,05%, proteína

3,14%, matéria graxa 0,194%, fibra 4,33%, cinza 2,18%, carboidratos 32,04%.Walter et al. (2010) encontraram valores para arroz de: Proteína 8,94%, matéria graxa 0,36%, fibra 2,87%, cinza 0,30%, carboidratos 87,58%.

Os valores apresentados tornam estas matérias-primas interessantes para o processo de hidrólise para obtenção de açúcares fermentescíveis. Segundo (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003) dentre as matérias-primas caracterizadas como amiláceas ou feculentas, a mandioca se destaca como excelente opção para a fermentação alcoólica por apresentar alto teor de amido.

Além da raiz *in natura* da batata-doce, também a farinha e farelo das raspas, podem ser utilizadas como matérias-primas para produção de hidrolisados. A diferença será refletida na proporção de água necessária para o cozimento, e concentração enzimática, que será maior devido a elevada concentração de amido presente na farinha e no farelo (SILVEIRA et al. 2008).

4.2 Resíduos Sólidos

Depois do processamento os resíduos sólidos foram submetidos à secagem e posteriormente foram moídos e caracterizados física e quimicamente. A caracterização dos resíduos é apresentada na Tabela 7, onde se tem o teor de umidade, as concentrações de carboidratos, amido, proteína bruta, extrato etéreo, fibra total, cinzas e acidez (mL de NaOH/100g).

Tabela 7. Composição físico-química dos resíduos sólidos do processamento das matérias-primas.

Resíduo /Análise	Mandioca	Batata-doce	Arroz	Sorgo	Milho
	Teores (% em base seca)				
Umidade inicial (% base úmida)	10,00	10,50	10,80	10,50	12,00
Carboidratos	54,12	45,00	40,45	47,43	43,49
Amido	3,30	2,00	3,00	3,20	4,30
Extrato etéreo	0,10	0,10	0,20	2,50	1,04
Proteína Bruta	0,95	1,60	7,80	6,20	6,20
Fibras	33,82	41,80	39,93	32,03	36,53
Cinzas	0,50	0,50	0,32	0,84	0,24
Acidez	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Observa-se que os teores encontrados podem ser comparados com resultados obtidos por: Rodrigues & Rodrigues (2012), onde foi caracterizado o resíduo sólido da obtenção de etanol a partir de batata-doce e foram encontrados teores de proteína: 4,02%; matéria graxa 1,73%, fibra 41,85%, carboidratos: 37,00% e pH 3,24 .

A presença de uma proporção de nutrientes orgânicos como proteína, fibra, carboidratos e matéria graxa nos resíduos analisados sinaliza potencialidade de uso na nutrição animal.

TEIXEIRA (1997) destaca algumas características sobre as análises acima realizadas. Dentre elas, sobre o teor de proteína bruta: permite identificar a qual classe o alimento pertence. Alimentos com valores de proteína bruta superiores a 20% são considerados proteicos. O extrato etéreo indica as frações orgânicas do alimento, sendo a que apresentou maior densidade energética. As fibras são as frações celulose e hemicelulose do material vegetal.

Considerando os dados de proteína bruta entre 0,95% (mandioca) e 6,20% (milho e sorgo), fibras totais entre 32,03% (sorgo) e 41,80% (batata-doce) expressos na Tabela 1, de acordo com a Classificação Adaptada do Dr. F. B. MORRISON (1966) apud TEIXEIRA (1997), os resíduos analisados podem ser classificados como sendo fontes de alimento energético.

Segundo MORISSON (1966) apud TEIXEIRA (1997), os alimentos energéticos são alimentos concentrados que possuem menos de 20% de proteína bruta (base seca). Da qual pode ter origem animal ou vegetal.

Quanto ao valor baixo de acidez (0,50), justifica-se por se tratar de resíduos da fermentação alcoólica de materiais amiláceos para produção de etanol evidenciando a formação de ácidos orgânicos como resultantes do processo fermentativo original. Por ser um resíduo ácido pode favorecer a estabilidade do material quando em condição de armazenamento.

4.3. Experimentação Animal:

O delineamento experimental para avaliar o uso dos resíduos estudados em alimentação de ratos determinou o uso de seis tipos de formulações (considerando as cinco matérias-primas usadas e uma testemunha).

4.3.1. Rações

Os resíduos sólidos obtidos foram incluídos separadamente nas formulações em 10% do total de cada obtendo assim seis formulações para seis tratamentos/grupos a ser avaliados (um resíduo = um tipo de formulação = um grupo).

A Tabela 8 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 1/Testemunha na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 8. Composição porcentual e bromatológica da ração usada como Testemunha

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	45,30
Resíduo	-0-
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	22,00
Fibra bruta	6,50
Carboidratos	55,00
Gordura	3,84

A ração usada no grupo 1/Testemunha foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Não teve inclusão de nenhum resíduo.

A composição química mostrou teores de proteína 20%, fibra bruta 6,50%, carboidratos 55% e gordura 3,84%.

A Tabela 9 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 2/Mandioca na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 9. Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Mandioca.

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	35,30
Resíduo (mandioca)	10,00
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	22,00
Fibra bruta	7,50
Carboidratos	52,50
Gordura	3,80

A ração usada no grupo 2/Mandioca foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Teve inclusão de 10% do resíduo sólido gerado no processamento da mandioca para produção de álcool.

A composição química mostrou teores de proteína 22%, fibra bruta 7,50%, carboidratos 52,50% e gordura 3,80%.

O uso dos resíduos sólidos provenientes a partir da produção de álcool a partir de mandioca na alimentação animal foi estudado e demonstrado que na alimentação de frangos de corte na fase início (1 a 21 dias) não se apresentaram alterações no desempenho das aves (CAMACHO, 2009).

A Tabela 10 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 3/Milho na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 10. Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Milho.

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	35,30
Resíduo (milho)	10,00
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	24,50
Fibra bruta	7,00
Carboidratos	53,00
Gordura	4,00

A ração usada no grupo 3/Milho foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Teve inclusão de 10% do resíduo sólido gerado no processamento do milho para produção de álcool.

A composição química mostrou teores de proteína 24,50%, fibra bruta 7,00%, carboidratos 53,00% e gordura 4,00%.

A Tabela 11 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 4/Batata-doce na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 11. Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Batata-doce.

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	35,30
Resíduo (batata-doce)	10,00
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	21,00
Fibra bruta	7,80
Carboidratos	54,50
Gordura	3,50

A ração usada no grupo 4/Batata-doce foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Teve inclusão de 10% do resíduo sólido gerado no processamento da batata-doce para produção de álcool.

A composição química mostrou teores de proteína 21,00%, fibra bruta 7,80%, carboidratos 54,50% e gordura 3,50%.

Rodrigues & Rodrigues (2010) realizaram estudos com o resíduo da batata doce após sua fermentação alcoólica em dietas para peixes e concluíram que o material apresenta potencial para formulação de rações para peixes em cativeiro. No entanto, os autores ressaltam que para que este potencial de uso seja efetivamente comprovado, há necessidade de se aprofundar os trabalhos devendo ser avaliadas

informações como: palatabilidade, efeitos de sua inclusão em formulações contendo outros ingredientes e forma de fornecimento aos animais.

A Tabela 12 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 5/Sorgo na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 12. Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Sorgo.

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	35,30
Resíduo (sorgo)	10,00
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	23,00
Fibra bruta	6,40
Carboidratos	53,00
Gordura	3,80

A ração usada no grupo 5/Sorgo foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Teve inclusão de 10% do resíduo sólido gerado no processamento da sorgo para produção de álcool.

A composição química mostrou teores de proteína 23,00%, fibra bruta 6,40%, carboidratos 53,00% e gordura 3,80%.

A Tabela 13 ilustra a formulação e a composição bromatológica da ração usada no grupo 6/Arroz na análise de segurança com ratos Wistar.

Tabela 13. Composição porcentual e bromatológica da ração com inclusão de resíduo a partir da matéria-prima Arroz.

Ingrediente	%
Farelo de soja	37,70
Milho (fubá)	35,30
Resíduo (arroz)	10,00
Sal comum	5,00
Farelo de trigo	5,00
Fosfato bicálcico	3,70
Óleo de soja	2,20
Premix (vit/mim)	0,60
Calcário	0,37
DL metionina	0,19
TOTAL	100
Composição Química	%
Proteína	25,00
Fibra bruta	5,00
Carboidratos	53,00
Gordura	3,80

A ração usada no grupo 6/Arroz foi balanceada com farelo de soja, milho, farelo de trigo, óleo de soja, fosfato bicálcico, sal, calcário, vitaminas, minerais e DL metionina. Teve inclusão de 10% do resíduo sólido gerado no processamento da sorgo para produção de álcool. A composição química mostrou teores de proteína 25,00%, fibra bruta 5,00%, carboidratos 53,00% e gordura 3,80%.

A ração usada no grupo 7/Comercial foi Presence Ratos e Camundongos fabricado pela empresa Precense Nutrição Animal. Produto destinado para a alimentação de ratos, camundongos e hamsters de laboratório. A composição química apresenta da no rotulo mostrou teores de proteína 23,00%, fibra bruta 5,00%, e gordura 4,00%.

4.3.2 Analise Comportamental dos Ratos

Os 56 ratos foram agrupados em sete grupos (oito animais por grupo), as Figuras a seguir ilustram os dados médios de consumo de ração e crescimento dos animais nas 5 semanas de experimento.

A Figura 11 ilustra os valores medios por animal de peso e consumo de ração formulada como testemunha, os animais de este grupo pesaram no inicio do experimento aproximadamente 105,25 g e terminaram aos 42 dias com 360,12g depois de consumir aproximadamente 1032,24 g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

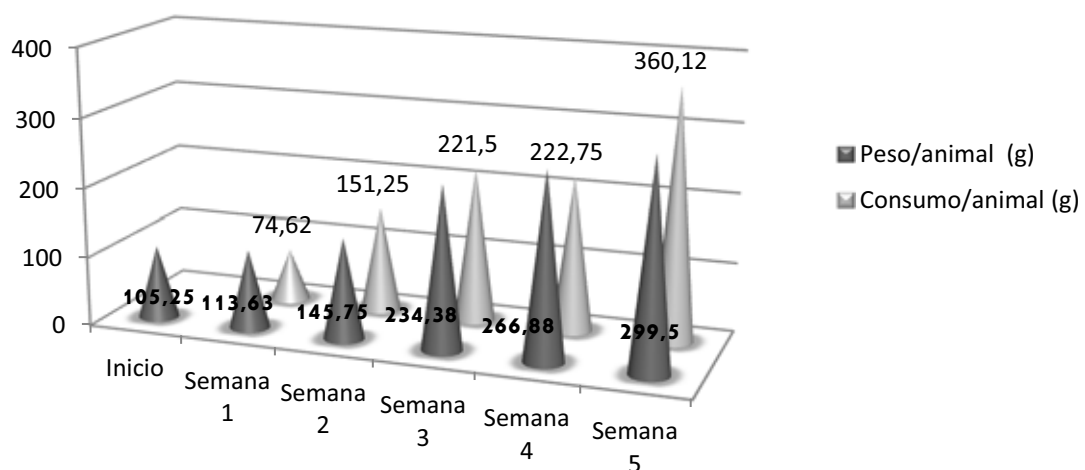


Figura 11. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada como testemunha.

A Figura 12 ilustra os valores medios por animal de peso e consumo de ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de mandioca, os animais de este grupo pesaram no inicio do experimento aproximadamente 110,88 g e terminaram aos 42 dias com 367,87g depois de consumir aproximadamente 1101,86 g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

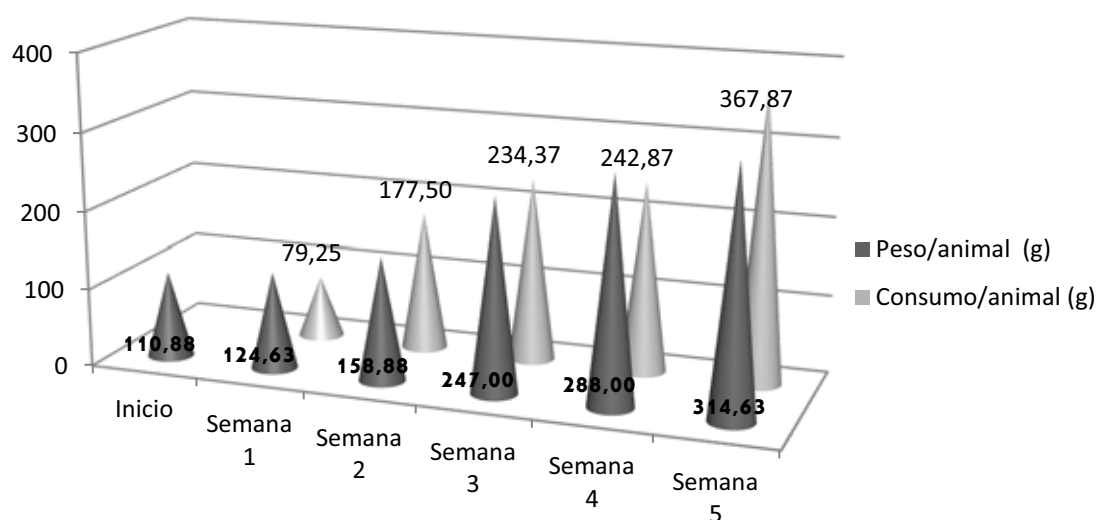


Figura 12. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de mandioca.

A Figura 13 ilustra os valores medios por animal de peso e consumo de ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de milho, os animais de este grupo pesaram no inicio do experimento aproximadamente 100,50g e terminaram aos 42 dias com 357,12g depois de consumir aproximandamente 1062,24 g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

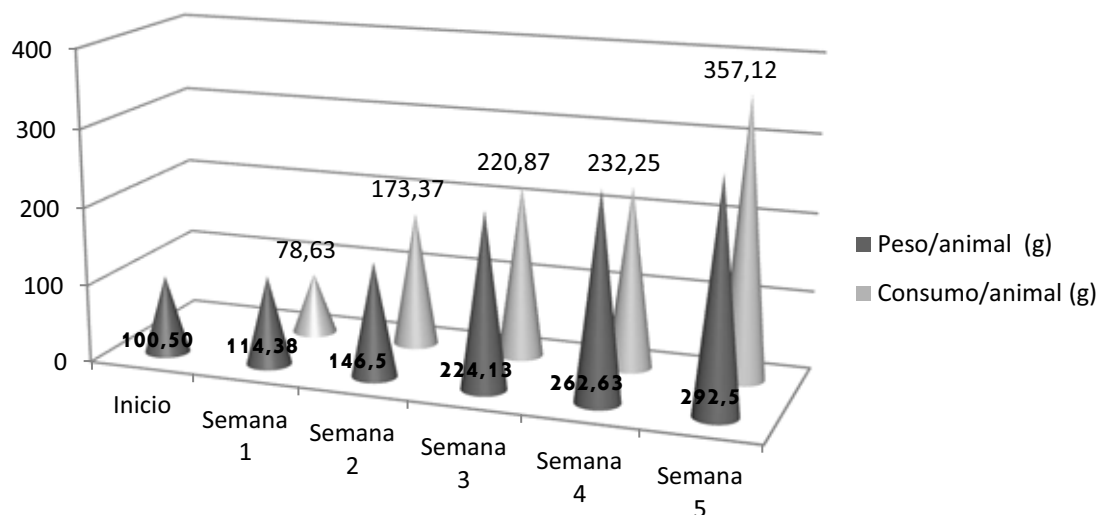


Figura 13. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de milho.

A Figura 14 ilustra os valores médios por animal de peso e consumo de ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de batata-doce, os animais de este grupo pesaram no início do experimento aproximadamente 100,50g e terminaram aos 42 dias com 284,88g depois de consumir aproximadamente 1197,11g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Durante a semana 4 e 5 os animais de este grupo alimentados com rações suplementadas com o resíduo sólido do processamento de batata-doce apresentaram diarreias, provavelmente o comportamento dos animais se deve ao teor de fibra na ração (7,80%) que se encontra perto do limite estabelecido por ANDRIGUETTO, 1990. Ikegami et al (1990), comprovaram que ratos alimentados com rações com mais de 8% de fibra apresentam menor ganho de peso e em alguns casos quadros de diarreia.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

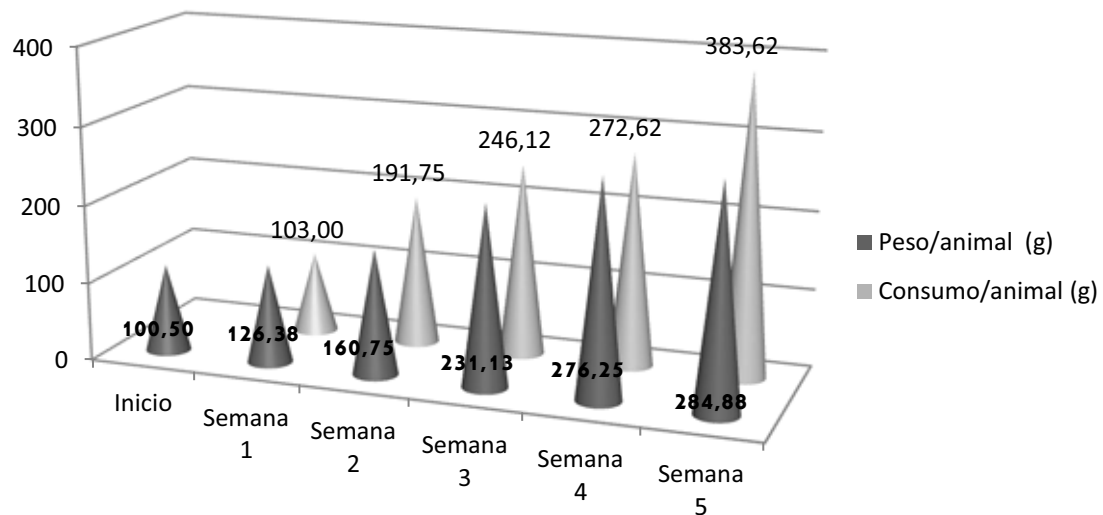


Figura 14. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de batata-doce.

A Figura 15 ilustra os valores médios por animal de peso e consumo de ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de sorgo, os animais de este grupo pesaram no início do experimento aproximadamente 107,00g e terminaram aos 42 dias com 317,75g depois de consumir aproximadamente 1126,37 g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais

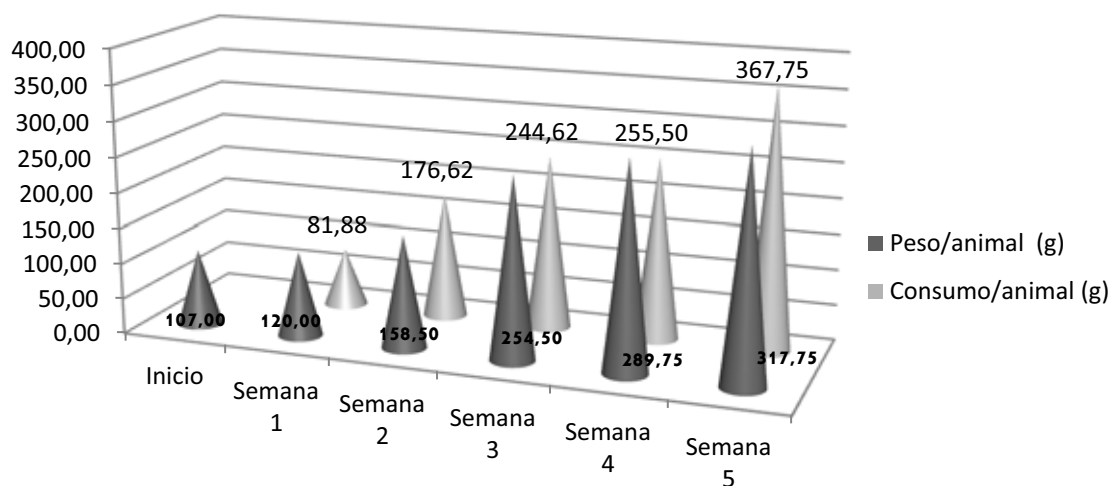


Figura 15. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de sorgo.

A Figura 16 ilustra os valores medios por animal de peso e consumo de ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de arroz, os animais de este grupo pesaram no inicio do experimento aproximadamente 100,50g e terminaram aos 42 dias com 304,50g depois de consumir aproximadamente 1060,74 g de ração.

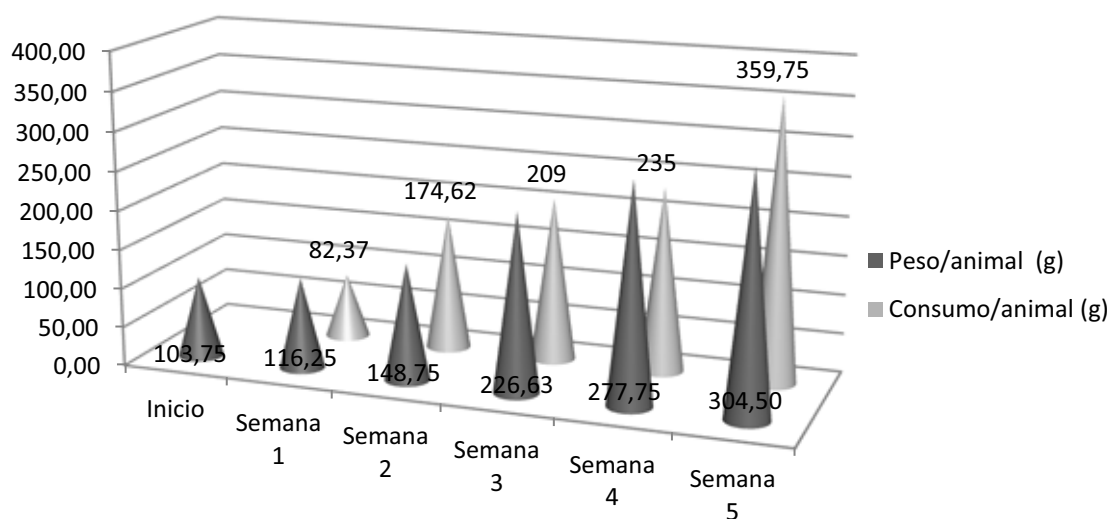


Figura 16. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração formulada com inclusão de resíduo sólido do processamento de arroz.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

A Figura 17 ilustra os valores medios por animal de peso e consumo de ração usada como testemunha comercial, os animais de este grupo pesaram no inicio do experimento aproximadamente 93,13g e terminaram aos 42 dias com 311,88g depois de consumir aproximadamente 948,25 g de ração.

As principais características comportamentais identificadas em todos os animais foram: a posição em pé, docilidade no manejo, lutas entre ratos e constante limpeza da pelagem, comportamentos normais segundo LAPCHIK, 2009.

Não se apresentaram situações de canibalismo e nenhum animal morreu durante a execução dos ensaios experimentais.

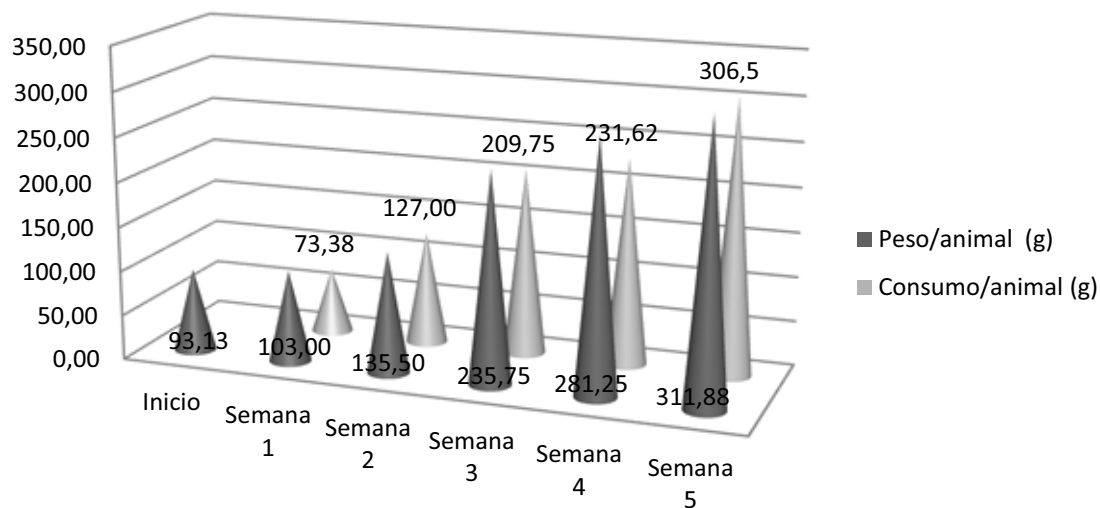


Figura 17. Valores médios dos valores, por animal, dos pesos e consumo da ração usada como testemunha comercial.

4.3.3 Desempenho

A Tabela 14 ilustra o teste de medias do consumo de ração, consumo de água, conversão alimentar e ganho de peso dos animais desde o dia 8 (depois da adaptação) ate o dia 42 quando foi realizada a eutanásia dos ratos.

Tabela 14. Resultados do desempenho médio dos grupos de consumos das rações formuladas.

Grupo	Consumo ração (g)	Consumo água (mL)	Conversão alimentar	Ganho de peso (g)
1/Testemunha	504,000 ab	11013,000 ab	1,675 bc	194,250 ab
2/Mandioca	506,500 ab	11566,000 ab	1,730 b	192,000 ab
3/ Milho	525,250 ab	11255,500 ab	1,665 bc	203,750 a
4/ Batata-doce	575,250 a	16257,000 a	2,020 a	172,500 b
5/ Sorgo	521,750 ab	11678,500 ab	1,645 bc	210,750 a
6/ Arroz	515,250 ab	11053,000 ab	1,690 bc	200,750 a
7/Comercial	452,375 b	6309,500 b	1,450 c	218,750 a
CV%	4,88	22,16	4,17	3,46

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados; o resíduo do processamento da batata-doce apresentou o maior consumo de ração (575,25 g) e água (16257,00 mL) e o menor ganho de peso (172,50 g) dos animais indicando baixo desempenho quando comparado com outros resíduos e com ração comercial. O desempenho da ração com inclusão de resíduo do processamento de batata-doce esta relacionado com o conteúdo de fibra apresentado na composição química da ração (7,80%), o limite máximo em rações para ratos deve ser 8% (POLLE, 1987; CALVERT et al., 1989). O maior ganho de peso foi conseguido o grupo 1 Testemunha (504,00 g) porem os tratamentos com inclusão de resíduos exceto batata-doce não apresentaram diferencias significativas nem no ganho de peso, nem na conversão alimentar.

GARCIA DE FARIA (2007) apresentou dados se de ganho de peso (190,00 g), consumo de ração (435,00 g) e conversão alimentícia (1,5), em ratos da linhagem Wistar em crescimento, alimentados com dietas extrusadas e peletizadas em

um período de 35 dias.

As rações suplementadas com resíduos sólidos do processamento de mandioca, arroz, sorgo e milho, associadas às rações testemunha e comercial, ofertadas a vontade, não interferiram estatisticamente em relação ao desempenho dos animais (Tabela 14), bem como nos pesos dos rins direito/esquerdo e fígado apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores médios dos valores, por grupo, dos pesos dos rins e fígado.

Grupo	Rim D (g)	Rim E (g)	Fígado (g)
1/Testemunha	1,300 a	1,277 a	10,340 a
2/ Mandioca	1,232 a	1,245 a	11,732 a
3/ Milho	1,340 a	1,317 a	11,867 a
4/ Batata-doce	1,209 a	1,165 a	10,274 a
5/Sorgo	1,444 a	1,402 a	11,986 a
6/ Arroz	1,349 a	1,335 a	11,632 a
7/Comercial	1,222 a	1,167 a	11,260 a
CV%	12,37	12,56	14,29

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os valores médios do tamanho dos órgãos dos ratos, não se apresentaram diferenças estatísticas de tamanho em rins direito/esquerdo ou fígado.

4.3.3 Função Renal

De acordo com os valores médios dos parâmetros bioquímicos (ALT e AST) foi avaliada a função renal dos ratos, os parâmetros avaliados no plasma sanguíneo dos animais, submetidos a rações suplementadas com resíduos sólidos do processamento de materiais amiláceos para fabricação de etanol, não apresentaram diferenças significativa independente da ração ingerida como pode ser observado na Tabela 16.

Tabela 16. Valores médios da concentração de ALT e AST no plasma de indivíduos dos grupos de ensaio.

Grupo	ALT (U.L ⁻¹)	AST (U.L ⁻¹)
1/ Testemunha	33,174 a	86,427 a
2/ Mandioca	33,174 a	86,427 a
3/ Milho	33,174 a	84,681 a
4/ Batata-doce	33,174 a	86,427 a
5/ Sorgo	34,047 a	84,681 a
6/ Arroz	33,174 a	83,808 a
7/Comercial	34,047 a	83,808 a
CV%	5,22	2,74

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores se assemelham aos observados por BRANCO *et al.* (2011) com camundongos Swiss onde foram achados valores de ALT (45,00 +/- 0,1), AST (78,00 +/- 0,1). Diferem dos valores encontrados por REIS (2011) onde foram achados em ratos Wistar valores de ALT (71,25a ±2,86) e AST (273,00 ±17,44).

4.3.4 Função Hepática

De acordo com os valores médios dos parâmetros bioquímicos (ureia e creatinina) foi avaliada a função hepática dos ratos, os parâmetros avaliados no plasma sanguíneo dos animais, submetidos a rações suplementadas com resíduos sólidos do processamento de materiais amiláceos para fabricação de etanol, não apresentaram diferenças significativa independente da ração ingerida como pode ser observado na Tabela 17.

Tabela 17. Valores médios da concentração de uréia e creatinina no plasma de indivíduos dos grupos de ensaio

Grupo	Uréia (mg.dL ⁻¹)	Creatinina (mg.dL ⁻¹)
1/Testemunha	33,854a	0,5294a
2/ Mandioca	39,104 a	0,5882 a
3/ Milho	35,301 a	0,3529 a
4/ Batata-doce	42,784 a	0,4117 a
5/ Sorgo	36,509 a	0,5294 a
6/ Arroz	31,922 a	0,5294 a
7/ Comercial	28,905 a	0,4117 a
CV%	19,91	39,94

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores se assemelham aos observados Castello Branco et al. (2011), com ratos Wistar onde foram achados valores de creatinina (0,3 +/- 0,1), e ureia (45,00 +/- 0,1), e valores encontrados por REIS (2011) onde foram achados em ratos Wistar valores de creatinina (0,45+/-0,064) e ureia (42,50±5,763).

4.3.5 Histologia

Os cortes histológicos foram observados ao microscópio (objetiva de 10x) e não foram observadas alterações histológicas associadas aos diferentes tratamentos. A Figura 18 mostra fotomicrografias representativas de cortes de estômago (porção glandular) dos diferentes grupos experimentais 1 a 7, respectivamente A Figura 19 mostra fotomicrografias representativas de cortes de fígado dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente. RC= Região centrolobular, RP= Região periportal. A Figura 20 mostra fotomicrografias representativas de cortes de intestino delgado (porção jejuno/íleo) dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente. MI= Mucosa intestinal, VI= Vilosidade intestinal. A Figura 21 mostra fotomicrografias representativas de cortes de intestino grosso dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente. MI= Mucosa intestinal. A Figura 22 mostra fotomicrografias representativas de cortes de rim dos diferentes grupos experimentais 1 a 7, respectivamente.. GL= Glomérulo renal, TR= Túbulos renais.

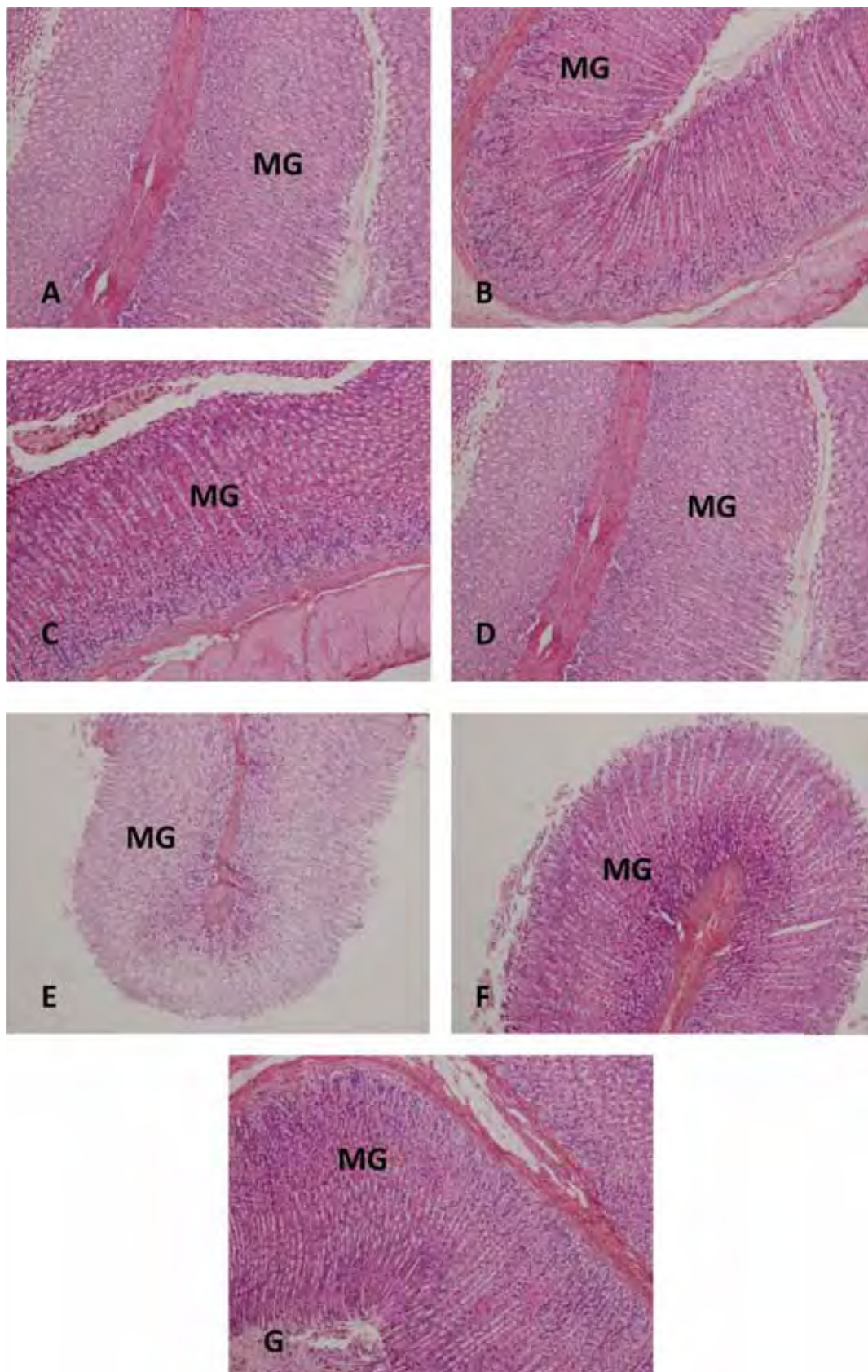


Figura 18. A-G) Fotomicrografias representativas de cortes de estômago (porção glandular) dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x). MG= Mucosa gástrica.

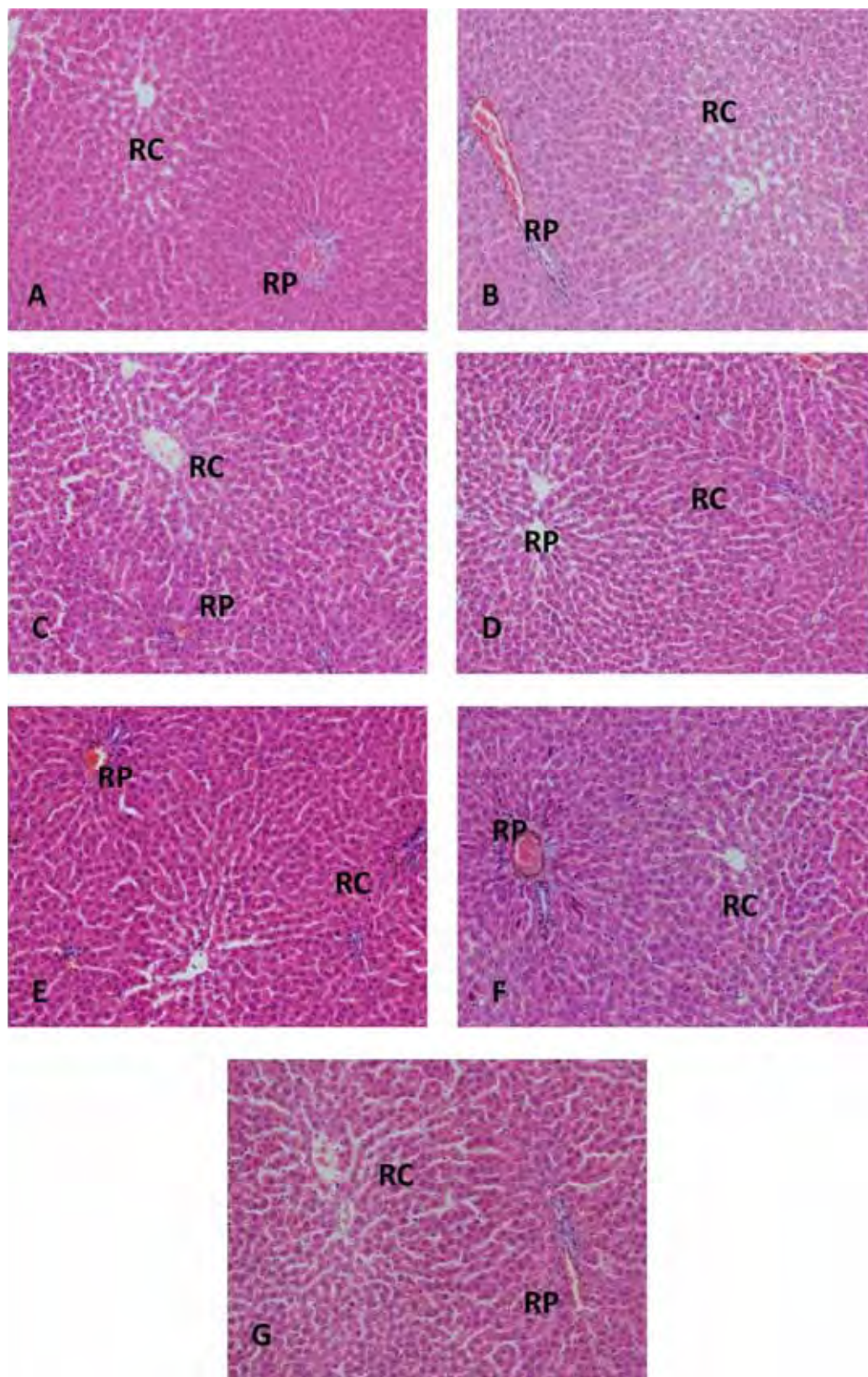


Figura 19. A-G) Fotomicrografias representativas de cortes de fígado dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x). RC= Região centrolobular, RP= Região periportal. Não foram observadas alterações histológicas associadas aos diferentes tratamentos.

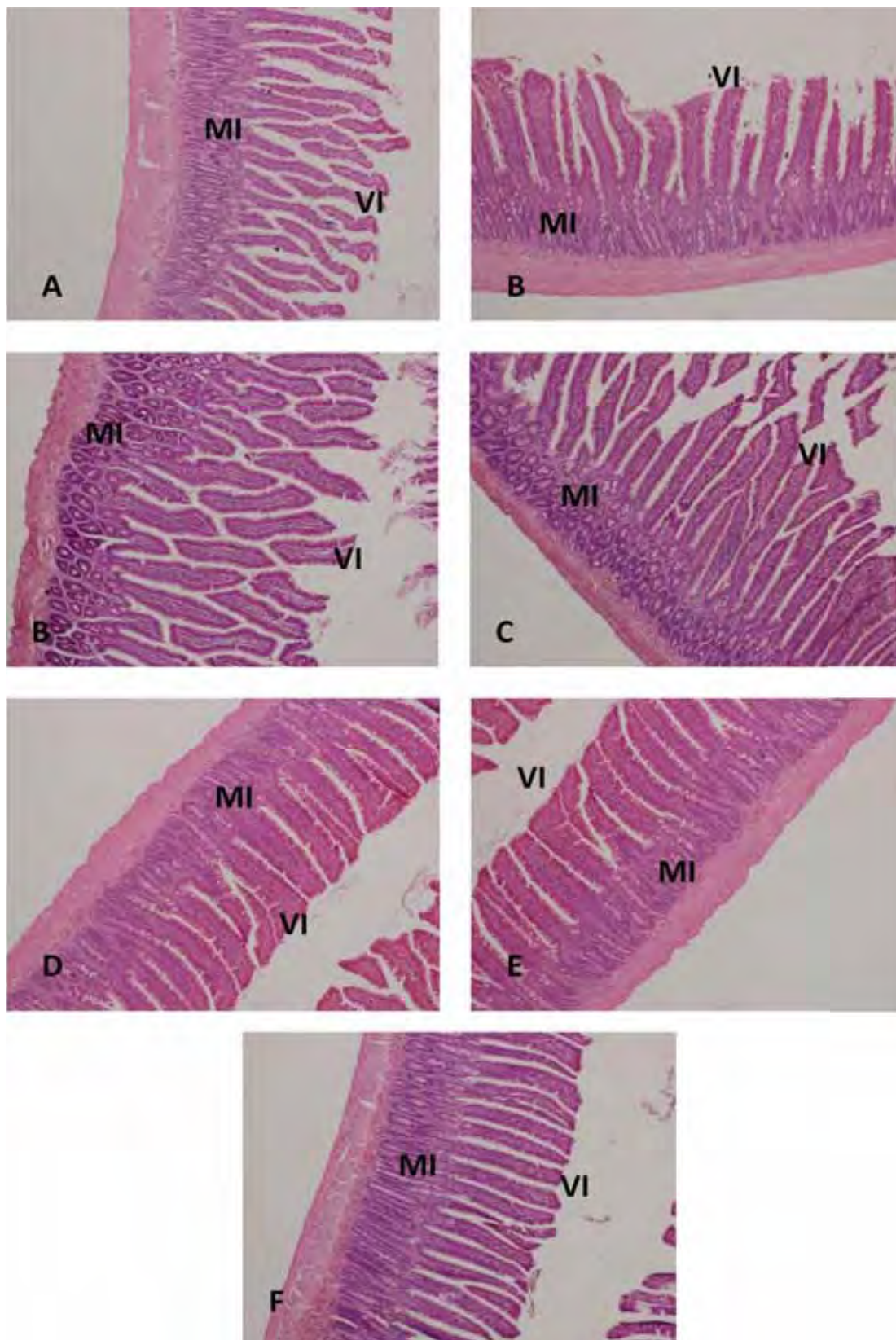


Figura 20. A-G) Fotomicrografias representativas de cortes de intestino delgado (porção jejuno/íleo) dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x). MI= Mucosa intestinal, VI= Vilosidade intestinal. Não foram observadas alterações histológicas associadas aos diferentes tratamentos.

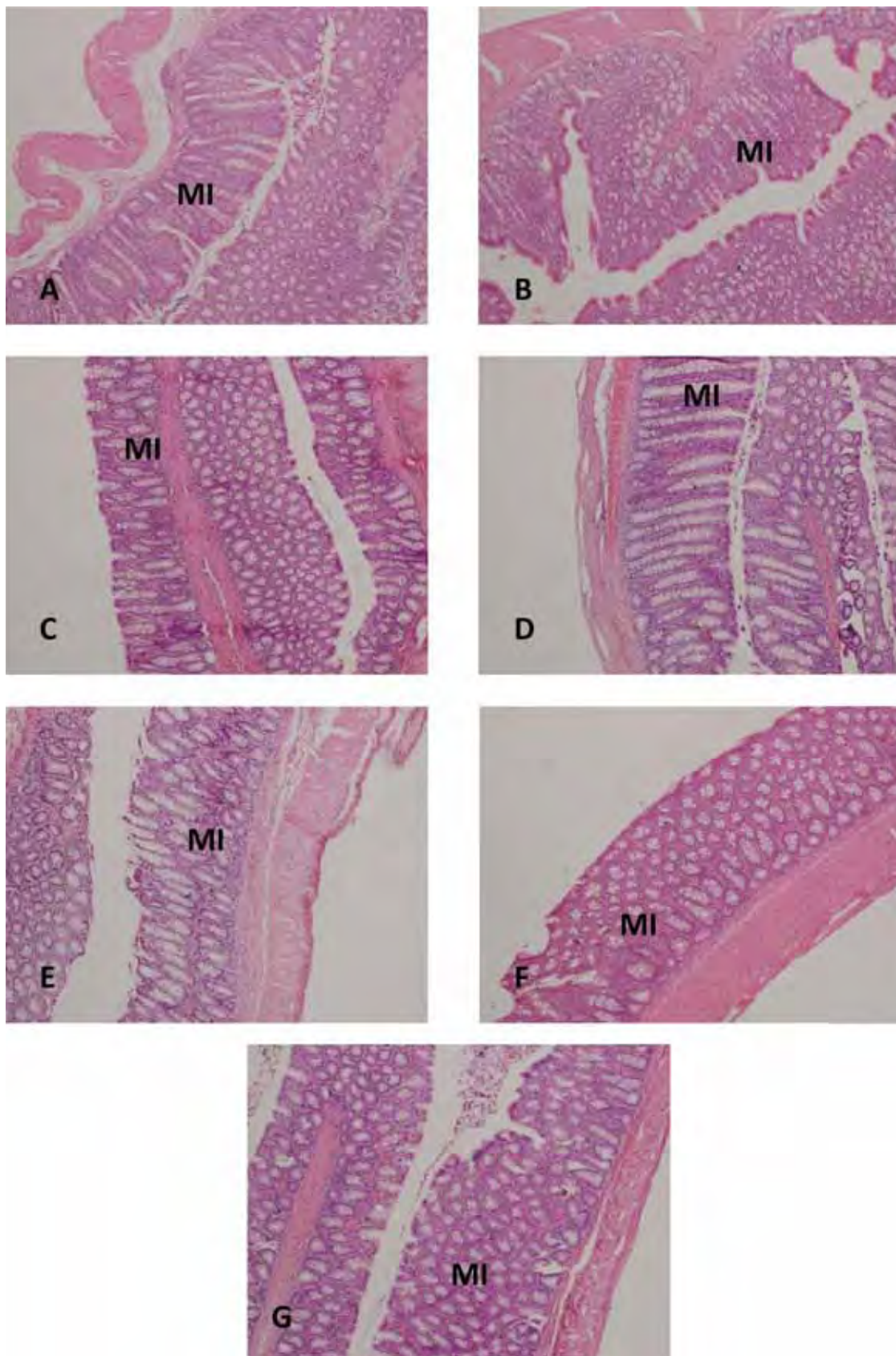


Figura 21. A-G) Fotomicrografias representativas de cortes de intestino grosso dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x). MI= Mucosa intestinal. Não foram observadas alterações histológicas associadas aos diferentes tratamentos.

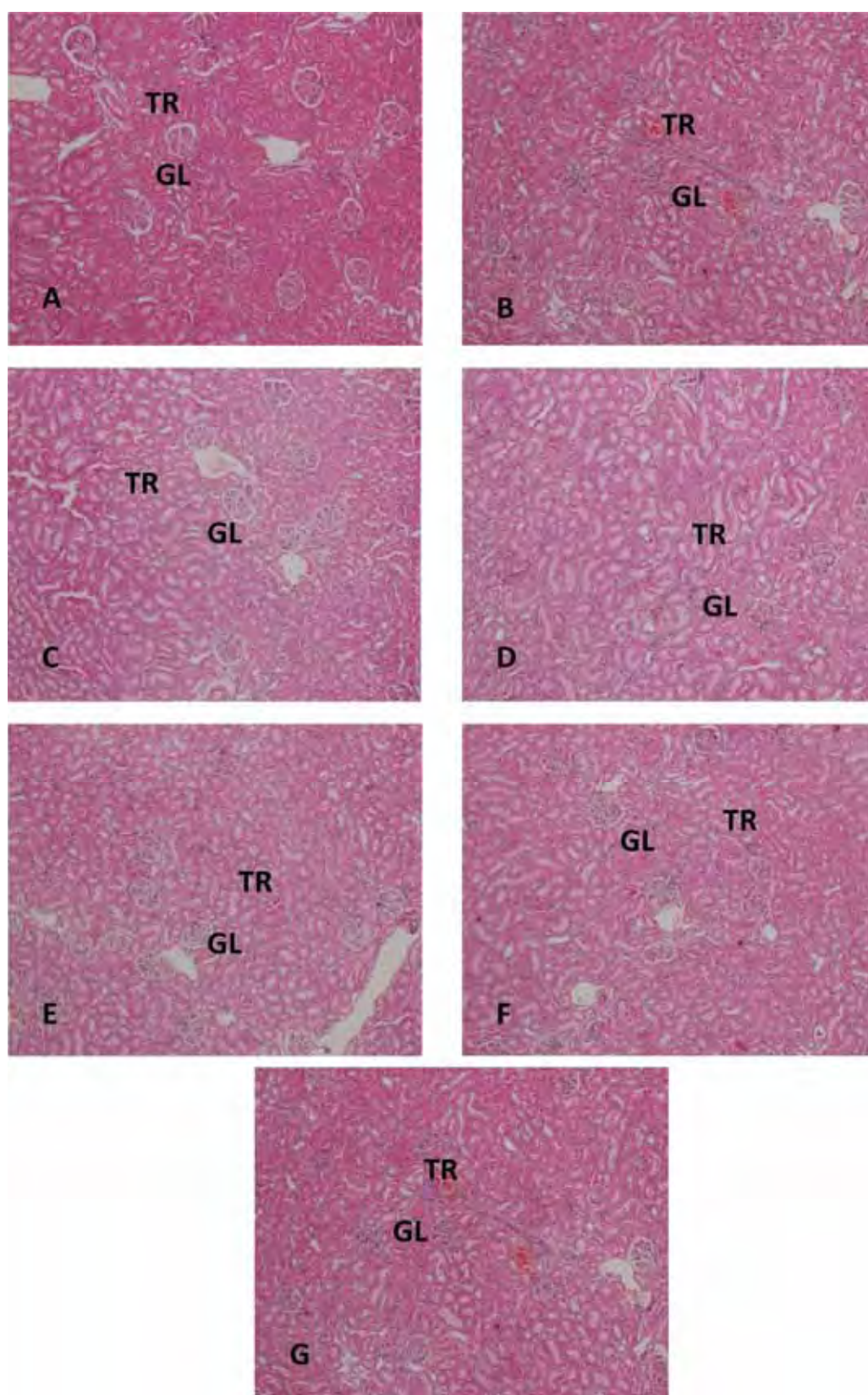


Figura 22. A-G) Fotomicrografias representativas de cortes de rim dos diferentes grupos experimentais 1 a 7 respectivamente (objetiva de 10x). GL= Glomérulo renal, TR= Túbulos renais. Não foram observadas alterações histológicas associadas aos diferentes tratamentos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biocombustíveis, para serem alternativas viáveis, devem apresentar um alto ganho de energia líquida, ter benefícios ecológicos, ser economicamente competitivos e produzir em grandes escalas sem prejudicar o abastecimento de alimentos.

As fases do processo industrial para obtenção de álcool a partir de matérias-primas amiláceas descritas no capítulo de materiais e métodos, estudadas na realização das provas experimentais na planta piloto do CERAT-UNESP mostram como é viável o funcionamento de pequenas destilarias (até 5000 litros de álcool por dia) em comunidades rurais que abrangem cooperativas de produtores organizados, este tipo de plantas são avaliadas igualmente no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) as pesquisas mostram que seu uso em pequenas comunidades dá ganhos na qualidade de vida dos moradores, a Figura 16 ilustra uma planta piloto instalada em CIAT-Colômbia; os resíduos sólidos gerados em esta planta estão sendo usados para a fabricação de blocos nutricionais, subministrados a bovinos de corte como veículo para ureia.



Figura 23. Planta piloto para fabricação de etanol CIAT-Colômbia.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Diante da caracterização da composição bromatológica dos resíduos produzidos a partir do processamento de mandioca, milho, sorgo, arroz e batata-doce para fabricação de álcool, conclui-se que os mesmos podem ser considerados como fontes de alimento energético em formulações de rações para ratos.
- O uso dos resíduos sólidos do processamento de mandioca, milho, arroz e sorgo na fabricação de bioetanol, suplementando rações para ratos não apresentou efeitos adversos no desempenho, quando incluídos em 10% nas rações, possibilitando seu uso em este tipo de aplicações.
- A inclusão de resíduos do processamento de batata-doce na fabricação de bioetanol em dietas para ratos apresentou efeitos adversos no desempenho dos animais quando incluídos em 10% nas rações, limitando seu uso em este tipo de aplicações.
- A inclusão de resíduos do processamento de mandioca, milho, sorgo, arroz e batata-doce na fabricação de bioetanol em dietas para ratos não causaram interferências na função renal ou hepática dos animais.
- Os cortes histológicos observados ao microscópio permitiram concluir que a inclusão de resíduos do processamento de mandioca, milho, sorgo, arroz e batata-doce na fabricação de bioetanol em dietas para ratos não causaram alterações histológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVAY, R. BIOCOMBUSTÍVEIS. **A energia da controvérsia**. São Paulo. Editora SENAC ISBN 978-85-7359-819-3, 2009. 184p

ANDRIGUETO, JM. **Normas e padrões de nutrição animal 89/90** – Nutrição Editora e Publicitária Ltda. Curitiba Paraná - 145p.

ANGLADETTE, A. **El Arroz**. *Edición Española*, ed. BLUME, Barcelona, 1969.867p.

ASSISTAT. **Assistência Estatística** Por Prof. Dr. Francisco de Assis Santos e Silva, versão 7.6 beta, Campina Grande: DEAG-CTRN-UFCG, 2012. . (Software estatístico).

BASTOS, DV. **Alcoolquímica**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007. Disponível em:
<http://www.ambiente.sp.gov.br/wpcontent/uploads/publicacoes/etanol/alcoolquimica.pdf>
f. Acesso em 6/jun/2012

AZEVEDO, SM. **Reação de clones de batata-doce aos insetos de solo**, Ciênc. Lavras, v.26, n.3, p.545-549, mai./jun., 2002.

BURMEISTER, JE. *et al*. Creatinina plasmática normal significa função renal normal?. Em **Revista da AMRIGS**, abr.-jun. 2007 pg. 114-117. Porto Alegre 2007

BRINHOLI, O. **Cultura do sorgo granífero**. (*Sorghum bicolor L.*). Botucatu: UNESP, Faculdade de ciências Agronômicas, (Trabalho apresentado pelos alunos do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Agricultura, na disciplina de Seminários). 1996. 196p.

BRITO. C. Uso do DDGS, um Subproduto na produção do etanol, na alimentação de monogástricos. Fevereiro /2008. Disponível em:
<<http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/192.pdf>>. Acesso em 6 jan. 2013

CABELLO, Produção de bioetanol de raízes de mandioca (Palestra). SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA. Pelotas/RS. 08/2010. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/simposio_agroenergia/palestras/12_quinta/manha/Prof%20Claudio/PALESTRA%20SIMPOSIO%20AGROENERGIA.pdf>. Acesso em 6 jan. 2012.

CABRAL, JE. **A cultura da batata-doce**. 2004. 96p. Embrapa Informação Tecnológica.

CAMILI, EA. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem o uso de agentes químicos**. 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

CAMILI, EA. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca**. 2009. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

CAMACHO, I. A. **Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para produção de bioetanol e sua utilização na alimentação de aves**. Botucatu. 2009. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

CAPUTO, L. F.G. **Manual da disciplina de Histotecnologia**. Curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitaria do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/img/capitulo_3_vol2.pdf>. Acesso em 14/jun/2012.

CAPOBIANGO, M. **Extração das proteínas do fubá de milho e obtenção de hidrolisados proteicos com baixo teor de fenilalanina**. Belo Horizonte, MG 2006. Dissertação (Mestrado/Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais.

CARDOSO, AD. **Avaliação de clones de batata-doce em Vitória da Conquista**. Horticultura Brasileira, Brasília, v.23, n.4, p.911-914, out-dez 2005

COSTA, J. Etanol de mandioca. Combustível produzido a partir do tubérculo é opção de negócio para produtores da região Norte do país. Revista Globo Rural, edição 296 – Jun 2010. Disponível em:

〈<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1707629-5809,00.html>〉

Acesso em 14 jun.2012

CRISPIM, J. C. **Manual da produção de aguardente de qualidade**. Guaíba, Agropecuária. 2000, 336p.

DESSEN, EM. Atualização em biologia molecular: a revolução genômica. Apostila.

Versão Eletrônica 2009. Disponível em:

〈<http://genoma.ib.usp.br/wordpress/wp-content/uploads/2011/04/apostila-Zona-Sul.pdf>〉

Acesso em 20 nov. 2012.

DIOS, L. Etanol de arroz cria alternativa de biocombustível e pode melhorar preço para produtores no RS. **Revista Planeta Arroz**/publicação trimestral de CASA BRASIL EDITORES Ltda.2012. 3p.

DORADO, R. Relatório de Projeto Bicombustível. Obtenção de Bioetanol Através de Milho, Sorgo e Batata-Doce em Escala Laboratorial e com Aplicação em Motor Stirling. Ministério da educação -Universidade federal do pampa. Bagé, 2009.

Disponível em: 〈<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAaz54AF/obtencao-bioetanol-atraves-milho-sorgo-batata-doce-escala-laboratorial>〉 Acesso em 1 jul. 2012.

DOS SANTOS, A. Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins. Embrapa Arroz e Feijão - Sistemas de Produção, No. Três. ISSN 1679-8869 Versão eletrônica. 2004.

Disponível em:

〈<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/index.htm>〉. Acesso 15 jun. 2012

ELLIS, R.P et al. Starch production and industrial use (Review). **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v.77, n. 3, p.289-311, 1998.

EMBRAPA 2009, Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amiláceas. Documento 94. Campinas, SP 2009. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/581052/1/doc941.pdf>>. Acesso 15 jun. 2012.

FILHO, WGV; MENDES, BP. In: Tecnologia. **Usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. V. 3, p. 530-575.

FIORETTO, RA. **Efeito da manipueira aplicada em solo cultivado com mandioca** (*Manihot esculenta*, Crantz). 1985. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.

FRANCO, CML, et.al. In: **Propriedades gerais do amido**. Metodologias de análise de amido. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 1, p. 185-203.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 308p.

GRIMALDI FILHO, G. **Manual de técnica histológica**. Rio de Janeiro: CME/IOC/Fiocruz, 1981.

KIERSENBAUM, AL. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Il. Tradução de: Histology and cell biology: na introduction to pathology, 2nd. 677p.

KOONAN, JP. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. Volume 30, pg 1341–1346. 2009.

LAPCHIK, VBV., MATTARAIA, VG., MIKO, G. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. 708p. São Paulo. Atheneu Editora, 2009.

LEONEL, M. CEREDA, MP. Sacarificação do resíduo fibroso de fécularias. I: Seleção da concentração do resíduo. In: **Jornada científica da associação dos docentes**, 19,

1995, Botucatu. Anais ... Botucatu: Associação dos Docentes, Universidade Estadual Paulista, 1995. p.203.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte fibras dietéticas. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 19, n. 2, p. 241-245, mai. 1999.

LEONEL, M., CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: glicose e álcool. In: CEREDA, M.P. (coord.). Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: **Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Fundação Cargill, 2001. v.4, cap. 22, p.280-290., 2001.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiol Behav.** V. 73, p.255-260, 2001.

LIMA, S. L. T. Reciclagem e biodegradação de plásticos. **Revista Científica do IMAPES**, Sorocaba, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2004.

LIMA, G. Produção de sorgo granífero no ceará. Conab, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_13_43_12_conjuntura_sorgo_granifero_em_graos_2012_ceara.pdf>. Acesso em 18 jun. 2012.

MAGALHÃES, PC.; DURÃES, FOM.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. 27 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 22).

MATTARAIA, VG. **Eficiência Reprodutiva de Ratos Wistar**: Sincronização, restrição alimentar e sistemas de produção. 2007. 83p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Botucatu.

MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo. 1980. 233p.

MINICIS, M. Enzimas Hepáticas: Porque são importantes para o estudo das doenças do fígado. Em: Prática Hospitalar. Ano IX. Nº51. Mai/Jun 2007. Disponível em: <http://www.fag.edu.br/professores/pos/MATERIAIS/An%E1lises%20Cl%C3%A9nicas%20Toxicol%C3%B3gicas/Bioqu%C3%ADmica%20Cl%C3%A9nica%20I/Enzimas_hepticas%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2012.

MONTEIRO, AB.; MASSAROTO, JA.; GASPARINO, CF.; SILVA, RR.; GOMES, LAA.; MALUF, WR.; FILHO, JCS. Silagens de cultivares e clones de batata doce para alimentação animal visando sustentabilidade da produção agrícola familiar. **Rev. Bras. de Agroecologia**. V2, N2.out. 2007.

NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*, V. 153, p.375-380, 1944.

OLIVEIRA, M. Opção produtiva: Sorgo é plantado para produzir etanol na entressafra de cana. **Revista Pesquisa FAPESP** - Edição 193 - Março de 2012.

PENIDO FILHO, P. **O álcool combustível**: Obtenção e aplicação em motores. São Paulo, 1981. 265p.

POOLE TB. **The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals**. London: Longman Scientific & Technical; 1999.

PONTE, J. J. da; FRANCO, A. Manipueira, um nematocida não convencional de comprovada potencialidade. Publicação da **Sociedade Brasileira de Nematologia**. V. 5, 1981.

PONTE, JJ.; FRANCO, A.; SANTOS, J. H. R. Eficiência da manipueira no controle de duas pragas da citricultura. In: Congresso Brasileiro de Mandioca. **Anais Sociedade Brasileira de Mandioca**, p.59, Recife, 1992.

REIS, A. Parâmetros metabólicos de ratos Wistar submetidos à dieta suplementada com estévia e açúcar. **Semana: Ciências Agrárias**, 2011. Londrina, V. 32, n. 4, p. 1477-

1488.

REDDY, B. V. S. develops sweet sorghum for ethanol production. 2004. Disponível em: <<http://www.icrisat.org/media/2004/media13.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

SALLAS, D. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho**. Botucatu, 2008 168p. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura). Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Botucatu.

SANTOS, M. R. V et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos. Wistar produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Em **SCIENTIA PLENA** V6, N. 10. 2010

Disponível em:

<<http://www.scientiaplenu.org.br/ojs/index.php/sp/article/viewFile/144/63>>

Acesso em: 2 jan. 2012.

SILVA, J.B. Cultura da batata-doce, 2004. Disponível em:

<<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>>. Acesso em 9 jul. 2012.

SILVA, RGV. **Caracterização físico-química de farinha de Batata-doce para produtos de panificação**. Itapetinga, Bahia, 2010. Dissertação (Mestrado/Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SILVEIRA, G. Porque produzir Etanol de Milho. 12 de março de 2012. Disponível em:

<<http://blogs.ruralbr.com.br/sojaporglaubersilveira/2012/03/12/porque-produzir-etanol-de-milho>>. Acesso 19 jun. 2012.

SILVEIRA, S. Orientações para práticas de laboratório. Universidade Federal de Santa Maria 2010. Disponível em:

<<http://w3.ufsm.br/labhisto/trabalhos/t%Dacnica%20de%20histologia.pdf>>.

Acesso em 22 nov. 2012.

SHAFERT, R. Sorgo bom de álcool. Jornal Estado de Minas Gerais. Disponível em: <<http://usibiorefinarias.com/view/667/sorgo-bom-de-alcool>>. Acesso em 18 jun. 2012.

SHERTZ, K.F; DALTON, L.G; Sorghum. **American Society of Agronomy**, Madison. 1980. 825p.

SCHWENGBER, DR. Mandioca a raiz do Brasil. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=302>>. Acesso em 1 mar. 2009.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biological Chemistry**, V. 160, p. 69-73, 1945

SONEGO, SJL. **Efeitos da Aplicação do Resíduo da Produção de Etanol de Batata Sobre Diferentes Culturas**. Santa Maria 2012, 69 p. Dissertação (Mestrado / Engenharia de Processos), Universidade Federal de (UFSM, RS).

TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de Ruminantes**. Lavras. Edições FAEPE, 1997. 96p.

TIMO-IARIA, C. Evolução histórica da experimentação animal em medicina. Em **Residente de Cirurgia**, capítulo 20, ed. I.N.Novaes, J.B.Mello & P. Nahas, Roca, São Paulo SP 1992, cap.20:64-71.

TRINDADE, SC. **Fuel ethanol issues in Thailand: ethanol production, stillage disposal and market penetration**. 1985. New York. 45p.

VIEIRA, L, M. Patentes em bioetanol evidenciam desenvolvimento brasileiro. Inovação Uniemp v.2 n.2 Campinas 2006. Disponível em: <http://inovacao.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180823942006000200012&lng=es&nrm=is&tlng=pt>. Acesso em 6 jun. 2012.

VIEITES, R. L. Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. 1998. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. V. 33, n. 8, p. 45-47.

YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.). **Starch chemistry and technology**. 2.ed. Academic Press, 1984. p. 249-283. Orlando, USA.

STEIN, H. H.; SHURSON, G. C. BOARD-INVITED REVIEW: The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets. **Journal of animal science**, v. 87, n. 4, p. 1292-1303, 2009.

WOSIACKI, G.; FIORETTO, AMC.; CEREDA, MP. **Utilização da manipueira para produção de biomassa oleaginosa**. In: CEREDA, MP. Resíduos da industrialização da mandioca. 1994. São Paulo.