

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOANA ANTUNEZ RIZZOLO

**ESTUDOS PARA O APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
VARIEDADES DE BATATA-DOCE [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]  
NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE  
ETANOL COMBUSTÍVEL E AGUARDENTE**

CURITIBA  
2014

JOANA ANTUNEZ RIZZOLO

**ESTUDOS PARA O APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
VARIEDADES DE BATATA-DOCE [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]  
NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE  
ETANOL COMBUSTÍVEL E AGUARDENTE**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adenise Lorenci Woiciechowski

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA  
2014



## RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos trinta e um dias do mês de outubro de 2014, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Centésima Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Adriane Bianchi Pedroni Medeiros (UFPR), Arion Zandoná Filho (UFPR), Maria Giovana Binder Pagnoncelli (UFRN), Luiz Gustavo Lacerda (UP), Susan Grace Karp (UP), Carlos Ricardo Soccol (UFPR) e Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR – orientadora da tese).

Às 08h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata Joana Antunez Rizzolo a fazer a apresentação da Tese intitulada: “Estudos para o aproveitamento biotecnológico de variedades de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] na fermentação alcoólica para a produção de etanol combustível e aguardente”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Drª Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, Dr Arion Zandoná Filho, Drª Maria Giovana Binder Pagnoncelli, Dr Luiz Gustavo Lacerda, Drª Susan Grace Karp, Dr Carlos Ricardo Soccol e Drª Adenise Lorenci Woiciechowski declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 31 de outubro de 2014.

Profª Drª Adriane B Pedroni Medeiros

Prof Dr Arion Zandoná Filho

Profª Drª Maria Giovana B Pagnoncelli

Prof Dr Luiz Gustavo Lacerda

Profª Drª Susan Grace Karp

Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

Profª Drª Adenise Lorenci Woiciechowski

## **Dedicatória**

Dedico à minha mãe Ana Luíza .

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade e orientação.

À Prof. Dr. Adenise L. Woiciechowski pela orientação, incentivo e credibilidade durante meus estudos.

Aos professores do programa: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Medeiros, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Vandenberghe, ao Prof. Dr. Júlio Carvalho e ao Prof. Dr. Letti por toda a ajuda e apoio.

Aos professores da banca examinadora, pelo tempo dedicado e pelas correções e sugestões:

Aos pesquisadores, cujos trabalhos serviram-me de consulta.

Aos profissionais que de alguma forma ajudaram em alguma etapa da pesquisa: Mitiyo Miyaoka, Susan Karp, Prof. Paulo Fontoura e Marcelo Zadorecki.

À Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS por ceder as amostras de batata-doce, em especial o pesquisador Luis Antônio Suita e à Nara Rocha.

Ao programa CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFPR pelas análises químicas das amostras de batata-doce.

Aos amigos e colegas de laboratório por toda ajuda e companheirismo, em especial às colegas Mara Eli e Suzan Rossi.

À minha família e ao meu companheiro Tiago.

## RESUMO

Atualmente uma das maiores preocupações governamentais do Brasil e do mundo é encontrar soluções que reduzam a dependência energética dos combustíveis fósseis, conciliada ao desenvolvimento de formas de produção de energia menos impactantes para o meio ambiente. O álcool combustível tem um peso crescente na matriz energética brasileira assim como as aguardentes tem um peso crescente na indústria de bebidas podendo trazer um desenvolvimento interno ao país. Para tanto, o objetivo do presente estudo foi produzir etanol a partir da batata-doce para estas duas finalidades. Para isso foram realizadas hidrólises ácidas de três variedades de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] (Amélia, Cuia e Rubissol) a fim de obter um caldo com alta concentração de açúcares fermentescíveis. Nas hidrólises as concentrações testadas de ácido clorídrico foram 1,5; 2,0; 2,5, 3,0; 3,5; 4,0 e 7,5% (v/v), a 100°C e 120°C e com um tempo de tratamento térmico de 15 minutos e 2 horas. Entre as três variedades de batata-doce estudadas, apenas uma foi selecionada, assim como entre quatro cepas de levedura estudadas, uma foi selecionada para realização de testes de otimização do processo de fermentação alcoólica e análise dos Compostos Orgânicos Voláteis. As fermentações foram conduzidas inicialmente em Erlenmeyers de 250mL em estufa a 30°C, com concentração de inóculo de  $10^7$  células/mL, por 24 horas. Foram realizados também estudos de aumento da concentração de inóculo para  $10^8$  células/mL, análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV), comparando a cepa anteriormente selecionada com outras duas cepas adquiridas de *Saccharomyces cerevisiae*, CA-11 e ATCC 26602. A melhor condição de hidrólise ácida encontrada foi com a menor concentração de HCl (1,5% v/v), constituindo um resultado positivo, pois acarreta redução de custos no processo sendo necessário menos ácido clorídrico para hidrólise assim como menos hidróxido de sódio para posterior neutralização. Nos primeiros ensaios de fermentação a cepa *Saccharomyces cerevisiae* LPB1-93 foi selecionada por melhor desempenho assim como a batata-doce variedade Cuia foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho. Nos estudos comparativos com as seguintes cepas LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602, todas *Saccharomyces cerevisiae*, a cepa LPB1-93 continuou sendo destaque quanto às melhores eficiências de fermentação, acima de 90%, maior consumo dos açúcares, produtividade alta em litros por hectare (11292 L/ha/ano) e pela presença de um número maior de COV nos fermentados, contribuindo para a qualidade da aguardente. Portanto, conclui-se que a batata-doce variedade Cuia pode vir a ser uma promissora matéria-prima para produção tanto de etanol combustível como de aguardente, podendo constituir uma fonte de renda alternativa e sustentável para agricultura familiar.

Palavras-chave: Etanol. Biocombustível. Hidrólise. Batata-doce. Produtividade. Agricultura familiar. Aguardente.

## ABSTRACT

Currently one of the largest concern of Brazil and the world governmental is to find solutions that will reduce the energy dependence from fossil fuel, reconciled to the development of less impactful on the environment. Ethanol fuel has an increasing weight in the Brazilian energy matrix as well as has spirits an increasing weight in the beverage industry, bringing an internal development to the country. Therefore, the objective of the present study was to produce ethanol from sweet potatoes for these two propose. For that hydrolyses acid were carried out with three varieties of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam (Amélia, Cuia and Rubissol) in order to obtain a broth with high concentration of fermentable sugars. In hydrolysis, the hydrochloric acid concentrations tested were 1.5; 2.0; 2.5, 3.0; 3.5; 4.0 and 7.5% (v/v), at 100°C and 120°C and with a heat treatment time of 15 minutes and 2 hours. Among the three varieties of sweet potato studied, only one was selected, as well as from four yeast strains studied, one was selected to perform the optimization of fermentation tests and analysis of Volatile Organic Compounds process. The fermentations were initially conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks in an incubator at 30 ° C with a inoculum rate of  $10^7$  cells/ml for 24 hours. Studies to increase the rate of inoculum to  $10^8$  cells/mL, analysis of Volatile Organic Compounds (VOCs) were also conducted comparing the strain selected with two other previously acquired strains of *Saccharomyces cerevisiae*, CA-11 and ATCC 26602. The best condition of acid hydrolysis was found with the lowest concentration of HCl (1.5% v/v), constituting a positive outcome because it entails lower costs in the process. In the first tests fermentation tests the strain *Saccharomyces cerevisiae* LPB1-93 was selected for best performance as well as the Cuia variety was chosen to continue the studies. In the following comparative studies with the LPB1-93, CA-11 strains and ATCC 26602, all *Saccharomyces cerevisiae*, the strain LPB1-93 continued being featured as the best yields above 90 %, higher sugar consumption and high productivity and by the presence of a larger number of VOCs in fermented, contributing to the quality of the spirit. Therefore, it is concluded that the variety of Cuia sweet potato can turn out to be a promising raw material for production of fuel ethanol as spirit, and may be an alternative and sustainable source of income for smallholder agriculture.

Key words: Ethanol. Biofuel. Hydrolysis. Sweet potato. Productivity. Family farming. Spirit.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - VARIEDADES DE BATATA-DOCE USADAS NO EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL..... 35
- FIGURA 2 - CONSUMO DOS AÇÚCARES TOTAIS E PRODUÇÃO DE ETANOL COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (A-B), *SACCHAROMYCES BOULARDII* (C-D), *CANDIDA TROPICALIS* (E-F) E *KLUYVEROMICES MARXIANUS* (G-H) SOB DUAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR APLICADAS PARA CADA CEPA..... 64
- FIGURA 3 - PERFORMANCE DAS FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA 0, 4, 6 E 10 G/L (GRÁFICOS A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE, UTILIZANDO-SE O HIDROLISADO DE BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA E COM A *S. CEREVISIAE* LPB1-93..... 82
- FIGURA 4 - BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA DA FERMENTAÇÃO DE 5 L (FSS), COM A CEPA LPB1-93..... 86
- FIGURA 5 - COMPARAÇÃO DAS PERFORMANCES DAS TRÊS CEPAS ESTUDADAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, A PARTIR DE HIDROLISADO DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA, LPB1-93 (GRÁFICOS A; B), CA-11 (GRÁFICOS C; D) E ATCC 26602 (GRÁFICOS E; F) QUANTO ÀS DUAS CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO APLICADAS,  $10^7$  CEL/ML (GRÁFICOS A; C; E) E  $10^8$  CEL/ML (GRÁFICOS B; D; F)..... 102
- FIGURA 6 - EFICIÊNCIA DAS FERMENTAÇÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO E DAS CEPAS ESTUDADAS (LPB1-93, CA-11 E ATCC 26602) COM A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^7$  CEL/ML DE MEIO..... 104
- FIGURA 7 - EFICIÊNCIA DAS FERMENTAÇÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO E DAS CEPAS ESTUDADAS (LPB1-93, CA-11 E

	ATCC 26602) COM A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE 10 <sup>8</sup> CEL/ML DE MEIO.....	104
FIGURA 8 -	BALANÇO DE MASSA DA CONVERSÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS PRESENTES EM 100 G EM BASE SECA DE BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA A ETANOL, PELAS TRÊS CEPAS ESTUDAS, EM 12 HORAS DE FERMENTAÇÃO.	109

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE AMÉLIA, COM AS CONCENTRAÇÕES DE HCL V/V, SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS ..... 43
- GRÁFICO 2 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE CUIA, COM AS CONCENTRAÇÕES DE HCL V/V, SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS ..... 44
- GRÁFICO 3 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE RUBISSOL, COM AS CONCENTRAÇÕES DE HCL V/V, SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS ..... 44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	TABELA DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BATATA-DOCE.....	23
TABELA 2 -	ANÁLISE CENTESIMAL DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS <i>IN NATURA</i> EM PORCENTAGEM SOBRE BASE ÚMIDA .....	39
TABELA 3 -	RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE AMÉLIA COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS .....	45
TABELA 4 -	RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS	45
TABELA 5 -	RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE RUBISSOL COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS .....	46
TABELA 6 -	PRODUTIVIDADE EM T/HA E AT EM T/HA DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS (AMÉLIA, CUIA E RUBISSOL).....	59
TABELA 7 -	PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE AMÉLIA EM 18 E 24 HORAS .	60
TABELA 8 -	PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA EM 18 E 24 HORAS .....	61
TABELA 9 -	PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE RUBISSOL EM 18 E 24 HORAS .....	61
TABELA 10 -	COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DAS QUARTO DIFERENTES CEPAS	

	UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA .....	65
TABELA 11 -	PERFORMANCE DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA QUANTO AO ETANOL PRODUZIDO, EM G/L, DA FERMENTAÇÃO COM CALDO GELATINIZADO, UTILIZANDO A BATATA- DOCE VARIEDADE CUIA .....	79
TABELA 12 -	CONSUMO DE AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE ETANOL (G/L) DA FERMENTAÇÃO COM CALDO NÃO FILTRADO DA VARIEDADE DE BATATA-DOCE CUIA .....	81
TABELA 13 -	PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO COM 5 LITROS DE CALDO HIDROLISADO FILTRADO (FL) DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA COM A CEPA S. CEREVISIAE LPB1-93.	83
TABELA 14 -	PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO COM 5 LITROS DE CALDO HIDROLISADO NÃO FILTRADO (FSS) DA BATATA- DOCE VARIEDADE CUIA COM A CEPA S. CEREVISIAE LPB1-93.....	83
TABELA 15 -	CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA 1 (FL) E DA VINHAÇA 2 (FSS) DAS FERMENTAÇÕES DE 5 L.....	88
TABELA 16 -	COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE $10^7$ CEL/ML E $10^8$ CEL/ML QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMTROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA LPB1-93, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS.....	105
TABELA 17 -	COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE $10^7$ CEL/ML E $10^8$ CEL/ML QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMTROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA CA-11, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS.....	105
TABELA 18 -	COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE $10^7$ CEL/ML E $10^8$ CEL/ML QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMTROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA ATCC 26602, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS.....	105

TABELA 19 - COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NAS FERMENTAÇÕES DE CADA CEPA ESTUDADA, A PARTIR DE CALDO HIDROLISADO DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA.....	108
--	-----

## **LISTA DE SIGLAS**

UFPR - Universidade Federal do Paraná

LPB1 - Laboratório de Processos Biotecnológicos 1

ATCC - American Type Culture Collection

COV - Compostos Orgânicos Voláteis

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>1. A produção de Etanol e suas vertentes</b> .....	<b>20</b>
1.1 Bioenergia .....	20
1.2 Economia.....	21
1.3 Meio ambiente e sustentabilidade.....	22
1.4 Batata-doce como matéria-prima para produção de etanol.....	23
1.5 Hidrólise.....	26
1.6 Aplicações do Etanol .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS</b> .....	<b>32</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>32</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>33</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>35</b>
2.1 Matéria-prima.....	35
2.2 Preparo da matéria prima .....	35
2.3 Análises Físico-químicas .....	35
2.3.1 Umidade .....	35
2.3.2 Carboidratos .....	36
2.3.3 Proteínas .....	36
2.3.4 Lipídios .....	36
2.3.5 Fibras .....	37
2.3.6 Cinzas.....	37
2.3.7 Amido e açúcares solúveis.....	37
2.4 Processo de hidrólise-sacarificação.....	38
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>39</b>
3.1 Caracterização da matéria-prima .....	39
3.2 Processo de Hidrólise-sacarificação.....	42
<b>4. Conclusão</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO II – ESTUDOS PARA A DEFINIÇÃO DE CULTIVAR DE BATATA-DOCE E CEPA DE LEVEDURA PARA O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA</b> .....	<b>52</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>52</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>53</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>56</b>
2.1 Agente da fermentação alcoólica .....	56
2.2 Fermentação alcoólica .....	56
2.3 Análise dos ensaios de fermentação .....	57
2.4 Cálculo da Eficiência da Fermentação (EF) .....	57
2.5 Cálculo da Produtividade do Etanol (PE).....	57
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>59</b>

3.1 Fermentação com levedura isolada de fermento de pão comercial utilizando as variedades Amélia, Cuia e Rubissol, de batata-doce hidrolisada.....	59
3.2. Fermentação do hidrolisado obtido da batata-doce variedade Cuia com quatro cepas de levedura disponíveis no LPB .....	63
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO III – ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA USANDO COMO SUBSTRATO A BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA E A CEPA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE LPB1-93 .....</b>	<b>72</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>72</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>73</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>75</b>
2.1 Gelatinização do amido presente na batata-doce e fermentação do caldo gelatinizado .....	75
2.2 Fermentação Semi-sólida (FSS) .....	75
2.3 Testes fermentativos com adição de fontes de nitrogênio .....	75
2.4 Aumento da escala de fermentação com Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS).....	76
2.5 Destilação dos caldos da Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS).....	76
2.6 Balanço de massa do processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia com a cepa LPB1-93 e caldo hidrolisado não filtrado (FSS).....	77
2.7 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis.....	77
2.8 Análise da vinhaça obtida na destilação do fermentado .....	78
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>79</b>
3.1 Gelatinização do amido presente na batata-doce e fermentação do caldo gelatinizado .....	79
3.2 Hidrólise e esterilização simultânea- Fermentação Semi-sólida.....	80
3.3 Testes fermentativos com adição de fonte de Nitrogênio .....	81
3.4 Aumento da escala de fermentação com Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS).....	83
3.5 Destilação dos caldos da Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS).....	85
3.6 Balanço de massa do processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia com cepa LPB1-93 e caldo hidrolisado não filtrado (FSS).....	85
3.7 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis.....	87
3.8 Análise da vinhaça obtida na destilação da FL e FSS.....	87
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM TRÊS CEPAS DE LEVEDURA QUANTO À PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL E AGUARDENTE A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA .....</b>	<b>93</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>93</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>94</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>98</b>
2.1 Micro-organismos estudados nas fermentações alcoólicas.....	98

2.2 Preparo do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia e fermentação alcoólica.....	98
2.3 Avaliação da influência da concentração de inóculo das cepas testadas na eficiência da fermentação alcoólica .....	99
2.4 Cálculo da Eficiência da Fermentação e da Produtividade do Etanol..	99
2.5 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV) produzidos no processo de fermentação alcoólica .....	99
2.6 Balanço de massa da produção de etanol combustível produzido na fermentação alcoólica a partir do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia .....	100
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>101</b>
3.1 Fermentação alcoólica com as três cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602) e aumento da concentração de inóculo.....	101
3.2 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis dos fermentados pelas três cepas estudadas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602) .....	107
3.3 Balanço de massa da produção de etanol combustível produzido na fermentação alcoólica a partir do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia .....	109
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>116</b>

## INTRODUÇÃO

Fatores políticos, consequências ambientais negativas resultantes do uso dos combustíveis fósseis e a busca pela independência do petróleo têm alimentado pesquisas para a produção de tecnologias alternativas de biocombustíveis renováveis em todo o mundo nos últimos anos. Evidência disso é que a substituição do petróleo por biocombustíveis derivados de uma fonte de energia renovável já é uma realidade, em muitos países.

As perspectivas de mercado para o etanol combustível são muito promissoras. No Brasil, a introdução de veículos flex tem levado à forte recuperação do mercado do etanol, que havia sido retirada após a crise de 1989/1990 de fornecimento.

Em todo o mundo, espera-se um crescimento significativo do mercado para o etanol. As condições agrícolas favoráveis e capacidades tecnológicas acumuladas por empresas nacionais fazem do etanol brasileiro um produto muito competitivo no mercado internacional, criando boas oportunidades de negócios para o país, além de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis, por razões ambientais e físicas. O petróleo (carbono fóssil) deve ser transportado desde as regiões de países produtores até o consumidor, e o etanol a partir de biomassas (carbono verde) está disponível em quase todas as regiões do mundo.

Além da aplicação do etanol como biocombustível, encontra-se grande aplicação desse produto em outros ramos, tais como: solvente industrial, antisséptico, conservante, alimentos, produtos de limpeza, remédios, fabricação de bebidas, etc. Na área de bebidas, destacam-se a cachaça e a aguardente com uma produção anual aproximada de 1,5 bilhão de litro, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil.

A busca por novas matérias-primas para produção de etanol já é realidade em vários países detentores de alta tecnologia.

A batata-doce, usada principalmente para a alimentação, tem sido apontada como uma matéria-prima alternativa para a produção de bioetanol devido ao curto ciclo de produção permitindo duas safras por ano, ampla adaptação a solos de baixa fertilidade e se enquadra no sistema de agricultura

familiar. Ela também tem um elevado rendimento de biomassa em comparação a outras culturas, além de ser facilmente sacarificada, pois a hidrólise do amido (polissacarídeo predominante nesta biomassa) é atingida em condições brandas de tratamento ácido-térmico. Com a tecnologia atual, cerca de 8 toneladas de batata-doce fresca podem produzir 1 tonelada de etanol.

Relatórios mostraram uma produtividade de cana de açúcar em 2012/13 de 74 t/ha e em 2013/14 de 72 t/ha, com um ciclo por ano, alcançando assim uma produtividade de etanol de aproximadamente 7000 L/ha.

Alternativamente, a batata-doce tem dois ciclos por ano, dobrando a produtividade anual de etanol em relação à produtividade da cana-de-açúcar que é anual.

Outro fator importante que tem uma grande influência na produtividade de etanol (L/ha) é a produtividade da cultura em toneladas por hectare. A produtividade média nacional da batata-doce é de 11 t/ha. Essa produtividade varia muito, dependendo da variedade da cultura, influenciando a viabilidade da produção de etanol a partir dessa matéria-prima. Tanto que variedades de batata-doce com maiores produtividades têm sido desenvolvidas para a produção de etanol, alcançando valores de 30 a 60 toneladas por hectare.

O Brasil, responsável pela segunda maior produção de etanol no mundo depois dos EUA, vem mostrando resultados que indicam que o aumento da produção do etanol combustível não tem sido obtido em detrimento da produção de alimentos, que vem crescendo também de forma expressiva. Portanto, os dois elementos essenciais para o desenvolvimento econômico de uma nação, soberania energética e segurança alimentar, podem ser conciliados sem alterar o desenvolvimento sustentável do país.

## OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese foi avaliar condições de pré-tratamento ácido-térmico de três cultivares de batata-doce e posterior fermentação do hidrolisado obtido com diferentes micro-organismos a fim de escolher as condições mais eficientes para a produção de etanol.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar as três variedades de batata-doce cedidas pela Embrapa Pelotas Clima Temperado e definir a melhor condição do processo de hidrólise ácida na sacarificação da fração amilácea da batata-doce
- 2) Avaliar a etapa de fermentação alcoólica com leveduras de fermento de pão comercial com as três variedades de batata-doce da Embrapa a fim de definir a variedade com melhor desempenho quanto a produção de etanol
- 3) Avaliar a etapa de fermentação alcoólica com quatro diferentes cepas de leveduras disponíveis no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*) com a variedade de batata-doce escolhida
- 4) Realizar testes de fermentação com a cepa selecionada a fim de otimizar o processo de produção de etanol
- 5) Realizar fermentações comparativas entre a cepa selecionada e outras duas cepas adquiridas (*Saccharomyces cerevisiae* CA-11 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602) produtoras de aguardente e de etanol combustível, respectivamente, apresentando duas alternativas de novos produtos a partir da batata-doce
- 6) Analisar os Compostos Orgânicos Voláteis produzidos durante as fermentações das três cepas, a fim de avaliar a qualidade de uma aguardente obtida na fermentação do hidrolisado de batata-doce.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. A produção de Etanol e suas vertentes

#### 1.1 Bioenergia

Frente ao esgotamento dos recursos energéticos do mundo, muitos grupos de pesquisa estão se concentrando para encontrar uma fonte alternativa de energia para atender as demandas atuais. Biomassas de plantas desempenham um papel importante, como fonte abundante e renovável de energia convertida pela ação de micro-organismos para produtos químicos como etanol (Junchen, 2012).

O etanol tem sido descrito como um dos mais especiais químicos por sua única combinação de propriedades como bebida, solvente, germicida, anti-congelante, combustível, calmante, e especialmente por sua versatilidade como um químico intermediário para outros químicos orgânicos (Akponah *et al.*, 2013).

O etanol é um combustível de motor de alta octanagem, derivado de plantas que podem ser seguramente usadas em qualquer plataforma de engenharia hoje, em vários níveis. Aproximadamente com 14 bilhões de galões produzidos, o etanol representa aproximadamente 10% do abastecimento de gasolina da nação e pode ser encontrado em 95% de toda gasolina vendida (RFA-Renowable Fuels Association, 2012).

Quimicamente o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, mandioca e batata-doce. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e grau de purificação pelo qual passou o produto (Lopes, 1987).

O Conselho Nacional do Petróleo (CNP) aprovou a resolução 01/1977 do Instituto de Álcool e Açúcar (IAA), definindo dois tipos de álcool carburante no Brasil e um tipo de álcool refinado. Um tipo refere-se ao álcool hidratado industrial, aquele cujo teor alcoólico é de 93,8 em peso de etanol e o restante de água. É usado puro como combustível em motores de combustão interna, como único combustível, sem a mistura com gasolina ou aditivo. Um segundo

tipo é o álcool anidro, o álcool desidratado, que é empregado em mistura adicionado à gasolina automotiva em proporções que variam de 15 a 25% (Lima *et al.*, 2001).

## 1.2 Economia

No Brasil há a cultura e a confiança de consumo do combustível etanol. Os brasileiros passaram a utilizá-lo ainda na década de 70, durante a crise mundial do petróleo, e o deixaram para trás como importante peça na matriz energética, no início da década de 1990, em virtude do fim do subsídio governamental e da concorrência da gasolina ofertada a baixo preço. Tal conjuntura atualmente está mudada. Embora haja notícias de descobertas de novos campos na costa brasileira, as reservas mundiais de combustíveis fósseis aproximam-se do esgotamento enquanto a demanda aumenta em ritmo frenético. O mundo ainda não foi capaz de adaptar-se a outra fonte energética mais limpa e renovável, porém o nosso país outra vez demonstrou ser mais aberto às inovações tecnológico-culturais do que qualquer outro. O surgimento dos veículos bicompostíveis (*flex fuel*) é um bom exemplo dessa sensacional adaptabilidade de consumo dos brasileiros (Rossafa, 2008).

A tecnologia dos motores bicompostíveis veio dar novo fôlego ao consumo interno de álcool. O carro que pode ser movido a gasolina, álcool ou a uma mistura dos dois combustíveis foi introduzido no País, em março de 2003, e conquistou rapidamente o consumidor. Hoje a opção já é oferecida para quase todos os modelos das indústrias e os automóveis bicompostíveis ultrapassaram, pela primeira vez, os movidos à gasolina na corrida do mercado interno. Além disso, no mercado internacional, o preço do petróleo atinge elevadas cotações (IBGE, 2006).

Os três anos decorridos após o lançamento do Programa Nacional do Álcool, com as primeiras medidas e iniciativas governamentais e particulares, visando às metas fixadas, permitiram a constatação de algumas diretrizes, como: necessidades de diversificação das matérias-primas utilizadas para produção de etanol; dimensões diversas de empreendimentos industriais, abrindo possibilidades para pequenas e médias empresas; regionalização das indústrias alcooleiras, com aproveitamento de recursos locais (Araújo, 1978).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol (atrás somente dos Estados Unidos). Estima-se que, entre 1975 e 2011, o consumo de etanol tenha substituído aproximadamente 330 bilhões de litros de gasolina. O uso do etanol também evitou a emissão de mais de 550 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> no mesmo período. Atualmente, a participação de combustíveis renováveis na matriz de transportes brasileira é de aproximadamente 22% (Chies, 2013).

Parte dos produtos químicos derivados do petróleo também pode ser obtida do etanol, em particular o eteno, matéria-prima para resinas, além de produtos hoje importados derivados do etanol, como os acetatos e o éter etílico. Da mesma forma, muitos produtos químicos eram obtidos de outras fontes fósseis, como o carvão, até serem suplantados pela petroquímica como fonte principal de matérias-primas quando o modelo de produção americano calcado no petróleo barato tornou-se hegemônico. Hoje, a indústria química mundial obtém mais de 90% da matéria-prima para síntese de moléculas orgânicas com base no petróleo. No futuro, por razões econômicas, a álcoolquímica poderá substituir a petroquímica e o etanol poderá assumir o lugar do petróleo como fonte de várias matérias-primas (Rossafa, 2008).

A produção de etanol, para fins combustíveis, a partir da batata-doce, apesar de ser viável do ponto de vista econômico, apresenta claras desvantagens com relação ao processamento a partir da cana-de-açúcar, que de fato tem uma maior rentabilidade unitária e ganhos de escala. Porém, quando se aborda a sustentabilidade de toda a cadeia produtiva da cana-de-açúcar, verifica-se que os custos causados pelas queimadas à sociedade fazem com que a mesma seja não sustentável (Magalhães *et al.*, 2012).

### **1.3 Meio ambiente e sustentabilidade**

Não é somente a questão do aumento do preço e a preocupação com o esgotamento das reservas que têm levado pesquisadores de todo o mundo a procurar alternativas para os derivados do petróleo. Desde que se descobriu que a temperatura média da Terra vem aumentando (atribuído também aos gases resultantes da queima de combustíveis fósseis), várias medidas foram tomadas para amenizar os efeitos advindos desse problema (Joseph Jr., 2008).

Dois fatos importantes têm influenciado fortemente o mercado de álcool: os altos preços do petróleo e as questões ambientais. Os maiores consumidores de derivados de petróleo mundiais têm buscado opções de abastecimento com outros combustíveis, notadamente os renováveis, cujos processos produtivos foram viabilizados pelos altos preços do petróleo. Além disso, as questões ambientais passaram a se sobrepor às econômicas em função da necessidade de redução das emissões de gases de efeito estufa na atmosfera, de modo a reduzir o processo de aquecimento global (Ventorim, 2008).

#### 1.4 Batata-doce como matéria-prima para produção de etanol

A batata-doce, cujo nome científico é *Ipomoea batatas* é uma hortaliça tuberosa originária da América do Sul, sendo que 90% da produção é obtida na Ásia.

A cultura adapta-se melhor em áreas tropicais onde vive a maior proporção de populações pobres. Nessas regiões, além de constituir alimento básico humano de bom conteúdo nutricional (TABELA 1), principalmente como fonte de energia e de proteínas, a batata-doce tem grande importância na alimentação animal e na produção industrial de farinha, amido e álcool. É considerada uma cultura rústica, pois apresenta grande resistência a pragas, pouca resposta à aplicação de fertilizantes, e cresce em solos pobres e degradados (Silva *et al.*, 2002).

TABELA 1 - TABELA DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BATATA-DOCE

Componente	Teor em base úmida (%)
Umidade	69,5
Proteína	1,3
Lipídios	0,1
Carboidrato	28,2
Fibra alimentar	2,6
Cinzas	0,9

FONTE: TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – UNICAMP (2011)

A composição química da batata-doce varia com a cultivar, condições climáticas, época da colheita, tratamentos culturais, duração e condições de armazenamento (Silva *et al.*, 2002).

Assim como a mandioca, o sorgo e a cana-de-açúcar, a batata-doce possui as qualidades necessárias para ser utilizada como matéria-prima na produção de álcool. Não sendo muito exigente quanto à qualidade do solo, pode ser cultivada em terras semiáridas, sem prejudicar as plantações desta raiz voltadas à alimentação humana (Araújo, 1978).

Uma vantagem competitiva da batata-doce é o seu curto ciclo de produção (5-6 meses), permitindo que sejam conduzidas duas safras por ano. Talvez um dos pontos fortes dessa cultura seja a sua aptidão natural voltada para pequenas e médias propriedades. Em função de sua rusticidade e das exigências de terras de baixa a média fertilidade (preços menores) e do ciclo curto, essa é uma planta que se enquadra perfeitamente no sistema de agricultura familiar (Silveira, 2008).

Comparada com culturas como arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce é mais eficiente em quantidade de energia líquida produzida por unidade de área e por unidade de tempo. Isso ocorre porque produz grande volume de raízes em um ciclo relativamente curto, a um custo baixo, durante o ano inteiro (Silva *et al.*, 2002).

Dos estados com maior participação na produção de batata-doce, destacam-se o Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. (Ferreira, 2008).

Segundo IBGE (2010), a produtividade média brasileira é de 11 toneladas/hectare.

Dentre todas fontes de matéria prima, a batata-doce é a cultura que apresenta o menor número de pesquisadores no Brasil envolvidos no seu estudo, seja para fins de consumo *in natura*, ou para indústria. Apesar do baixo interesse pela batata-doce, possivelmente por ser uma cultura de subsistência, ela apresenta um elevado potencial para produção de etanol, pelo custo de produção, e por apresentar uma boa produtividade. Acrescenta-se a isto uma maior rusticidade e excelente desempenho da cultura nas nossas condições tropicais (Souza, 2005), além de ter grande quantidade de amido, carboidrato que pode ser hidrolisado em condições brandas, quando comparado com a sacarificação da celulose.

Durante o ProÁlcool, fontes de matéria-prima como a mandioca e a batata-doce, entre outras, foram cogitadas para a produção de etanol. Contudo, os projetos nessas áreas pouco avançaram, muito provavelmente em razão de

algumas limitações agronômicas, dentre as quais a produtividade e a incidência de pragas e doenças. Por ocasião do uso da mandioca para a produção de etanol, a batata-doce também foi escolhida como fonte promissora em razão, principalmente, do seu ciclo curto de produção (4/5 meses) (Silveira, 2008).

Na década de 80, Sachs (1980) recomendou a substituição do uso de grãos, como o milho, nos processos fermentativos para a obtenção de etanol. Segundo este autor, dentre as várias matérias-primas alternativas para a produção de etanol, destacou-se a batata-doce, que foi considerada adequada para esta finalidade. Porém a produtividade de amido por hectare da batata-doce deve ser superior à dos grãos e as cultivares devem ter alto teor de amido. De acordo com Wu (1988), as eficiências dos processos fermentativos para produção de etanol a partir da batata-doce variam entre 87 e 93%, de acordo com a cultivar e com o teor de matéria seca das raízes. Conforme Silveira (2006), as principais características para que a cultura se torne uma opção real no programa brasileiro de bioenergia são: elevada produtividade, alto teor de matéria seca, resistência a insetos de solo e doenças.

Ziska *et al.* (2009) reportam que a batata-doce variedade "Beauregard" pode ser uma potente matéria-prima alternativa para biocombustível, altamente competitiva com a maioria das outras fontes de biocombustível nos Estados Unidos da América.

Talbert *et al.* (1983) avaliaram o potencial produtivo de álcool de oito culturas comerciais e a batata-doce foi a mais viável para a produção de etanol, sendo obtidos 1.780 litros de etanol por hectare, com possibilidades de se chegar a 2.806 L/ha.

Collins (1984) avaliou a produtividade de etanol a partir de nove genótipos de batata-doce na Carolina do Norte (EUA) sendo que as cultivares "Pelican Processor" e "Jewel" foram as mais produtivas, respectivamente com 58,6 e 50,2 t/ha de raízes. Destas, a "Pelican Processor" destacou-se pela maior produtividade de matéria seca por hectare (18,3 t/ha) e de etanol (8.597 L/ha).

Kim e Hamdy (1985) obtiveram para a batata-doce cultivar "Georgia Red" (23,6% de matéria seca e 21,4% de amido) uma produtividade de 30,8 t/ha de raízes, o que equivale a 4.032 litros de etanol por hectare.

Silveira (2008) mostra uma síntese dos resultados com o estudo e avaliação da batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol de 1997 até 2007 e relata que, dentre os 102 clones coletados na região Norte, dez cultivares mostraram-se promissoras para a produção de etanol, com elevado teor de amido, produtividade, resistência aos nematoides das galhas e insetos de solo. Com ciclo de produção variando de 4 a 6 meses, essas cultivares podem representar uma boa alternativa para a agricultura familiar, com a possibilidade de implantação de miniusinas de álcool combustível com capacidade de produção de 6.402 litros até 10.542 litros de etanol por hectare.

### **1.5 Hidrólise**

O amido é um homopolissacarídeo depositado nos cloroplastos das células vegetais como grânulos insolúveis. É a forma de armazenamento de glicose nas plantas e é empregado como combustível pelas células. É constituído por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina (Motta, 2005).

A hidrólise química do amido é bastante utilizada no Brasil, em razão do seu baixo investimento, baixa necessidade de energia e de produtos químicos. O rendimento do processo é calculado sobre a quantidade usada de matéria-prima, mais comumente considerando a quantidade de amido que entrou no processo. O fracionamento do amido em cadeias menores é acompanhado pela adição de uma molécula de água (hidrólise) em cada ligação rompida (Sumerly *et al.*, 2003).

A batata-doce é uma matéria-prima com forte potencial para produção de hidrolisados, pois contém um alto teor de carboidratos na forma de amido. O amido da batata-doce, depois de hidrolisado à glicose, juntamente com outros açúcares redutores presentes na planta em quantidades menores, pode ser fermentado para a produção de etanol (Rizzolo *et al.*, 2012).

### **1.6 Aplicações do Etanol**

Por ser uma molécula muito simples, de fácil obtenção, de baixo peso molecular, contendo oxigênio, miscível com a grande maioria dos líquidos de

baixo peso molecular, o etanol possui diversas aplicações, como combustível, solvente industrial, antisséptico, conservante, na indústria de alimentos, produtos de limpeza, remédios, na fabricação de bebidas, além de ser utilizado como intermediário na síntese de químicos.

Na área de bebidas, destacam-se a cachaça e a aguardente, sendo a cachaça a terceira bebida mais consumida no planeta, firmando-se como um importante produto do agronegócio brasileiro (Verdi, 2006). Em função da não disponibilidade de dados oficiais atualizados sobre o tema, estima-se que o mercado nacional de cachaça seja de cerca de 1,2 bilhão de litros/ano (SEBRAE, 2013). Dessa quantia anual, 70% refere-se à cachaça industrial e 30% refere-se à cachaça artesanal. Esse consumo é provavelmente bem maior em função da informalidade e do consumo não declarado.

A cachaça, além de fazer parte do cenário histórico e cultural do Brasil, mostra-se, no contexto contemporâneo, inserida não só no mercado nacional, como também no mercado internacional. No que diz respeito à questão cultural, a cachaça apresenta-se em um processo de mudança de status, o que podemos chamar de gastronomização do produto, que tem contribuído significativamente para um consumo nacional diferenciado, pois o seletor público mostra-se exigente e com maior poder aquisitivo (Souza, 2012).

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características peculiares. Já a aguardente é uma bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida do rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples ou pela destilação do mosto fermentado. A aguardente deve ter a denominação da matéria-prima de sua origem e se contiver açúcares em quantidade superior a seis gramas por litro e inferior a trinta gramas por litro será denominada de aguardente adoçada (DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009).

Diversos fatores já citados como a busca pela independência dos combustíveis fósseis, o aumento da demanda por etanol em função da alta produtividade de carros com motores flexfuel e das altas dos valores da gasolina, a crescente preocupação com a problemática dos gases do efeito

estufa provenientes da queima de combustível por motores automotivos, as altas produtividades alcançadas de variedades de batata-doce em t/ha são favoráveis ao estudo e uso dessa hortaliça como matéria-prima alternativa a cana-de-açúcar, para a produção de etanol, visando a implementação de usinas regionais favorecendo a agricultura familiar no Brasil.

## REFERÊNCIAS

AKPONAH E.; AKPOMIE O. O.; UBOGU, M. Bio-ethanol production from cassava effluent using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from rafia palm (*Elaeis guineesi*) SAP. **European Journal of Experimental Biology**, 3(4):247-253, 2013.

ARAÚJO, N. Q.; *et al.* **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol**. [s.l.], 1978.

CHIES, V. Sobre a semana de bioenergia. **Agroenergético**, Informativo da Embrapa Agroenergia, Edição nº 40, 2013.

COLLINS, W. W. Progress in developing sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars for fuel alcohol production. In: **VI Symposium of the International Society for Tropical Roots and Crops**. Lima, p. 571-575, 1984.

FERREIRA, A. Batata-doce. Edição 713, **Revista A Granja**, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**. Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, 2010.

JOSEPH, H. J., O Uso do Álcool Combustível nos Veículos *Flex Fuel*. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

JUNCHEN, L.; IRFAN, M.; LIN, F. Bioconversion of agricultural waste to ethanol: A potential source of energy. **Archives Des Sciences**. v.65, n.12, 2012.

KIM, K; HAMDY, M.K. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.3, p. 31-320, 1985.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 1º edição, v.3, cap 1:1-43, 2001.

LOPES, C. H. **Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira**. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Alcool, 32p. 1987.

MAGALHÃES, K. B.; RODRIGUES, W ; SILVEIRA, M. A. Análise custo-benefício social da cadeia produtiva de etanol de batata-doce no Estado de Tocantins. **Custos e @gronegocio on line**. v. 8, n. 1, 2012.

MOTTA, V.T. **Bioquímica**. Caxias do Sul, RS: Educs, 2005.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **2012 pocket guide to ethanol**. February, 2012.

RIZZOLO, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Estudos de diferentes condições de hidrólises ácidas da batata-doce para produção de etanol. **7º Congresso de Bioenergia**, São Paulo-SP, 2012.

ROSSAFA, L. A. Alcool: Combustível para o Desenvolvimento Nacional e Construção da Paz Mundial, Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Alcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

SACHS, R.M. Crops feedstock for fuel alcohol production. **California Agriculture**, v.34, n.6, p. 11-14, 1980.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Cachaça Artesanal** - Estudos mercadológicos, 84 p. 2013.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.2, cap.22, p 448-505. 2002.

SILVEIRA, M. A.; TAVARES, I. B.; ANDRÉ, C. M. G. *et al.* Seleção de acessos de batata-doce obtidos via programa de melhoramento genético visando à produção de etanol no Estado do Tocantins. In: **Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre-PUC/ABES-RS. 19 p. 2006.

SILVEIRA, M. A. Batata-Doce: uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Alcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

SOUZA, A. F. B. C. **Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce**. Palmas, 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SOUZA, V. L. Da produção ao consumo da cachaça artesanal orgânica em Minas Gerais: uma questão de Comunicação Mercadológica. In: **II Conferência Brasileira de Estudos Em Comunicação e Mercado**. O Re-Pensar e o Re-Fazer da Comunicação com o Mercado. São Bernardo do Campo: UMESP, p. 1-11, 2012.

SURMELY, R. *et al.* Hidrólise do Amido. In: **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.3, cap.15. p. 377-399, 2002.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA. Universidade Estadual de Campinas. 4° ed. - Campinas: **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA)**, 2011.

TALBERT, D.M.; SIMS, E.T. HAMMING, M.D. The ethanol production potencial of sweet potato and jerusalem artichoke: A review conducted for the savannah river plant. **Hortscience**, v.18, n.2, p.168, 1983.

VENTORIM, F.; MACHADO, G. Álcool Combustível na Matriz Energética Brasileira. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, SP, v.36, n.2, fev. 2006.

WU, Y.V. Characterization of sweet potato stillage and recovery of stillage solubles by ultrafiltration and reverse osmosis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, n.2, p. 252-256, 1988.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TORBET, H. A.; SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland, **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1503-1508, 2009.

## **CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS**

### **Resumo**

A batata-doce é uma hortaliça que pode ser cultivada em áreas degradadas e com baixo custo de manejo. Devido à sua alta produtividade, tem-se mostrado uma promissora fonte alternativa para produção de etanol. A fim de obter caldos com altas concentrações de açúcares fermentescíveis, o objetivo do presente estudo foi caracterizar as três variedades de batata-doce (Amélia, Cuia e Rubissol) e testar diferentes condições de hidrólises ácidas. As cultivares foram fornecidas pela Emprapa Clima Temperado. Foram testadas diferentes concentrações de ácido clorídrico (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 7,5% v/v), temperatura (100°C e 120°C) e tempo de tratamento térmico (15 minutos e 2 horas). Os resultados da caracterização mostraram que a composição centesimal das três variedades de batata-doce estudadas ficou próxima às apresentadas por outros autores. As melhores condições de hidrólise foram com 1,5 e 2% de HCl v/v, a 120°C, por 15 minutos. Concentrações de ácido mais elevadas levaram à degradação dos açúcares, diminuindo a eficiência do processo. Portanto, condições mais brandas, usando menos ácido, foram as mais eficientes favorecendo o processo com redução de custos. Conclui-se então que é necessário conhecer a matéria-prima em estudo e adaptar métodos de tratamento térmico para alcançar os objetivos. Sendo assim, acredita-se na possível implementação de usinas de etanol no Brasil, a partir de eficiente sacarificação da fração amilácea de batata-doce.

## 1. Introdução

Muitos apontam o Brasil como o país que mais reúne vantagens competitivas para liderar a agricultura de energia, com o maior potencial de crescimento na produção de energia renovável, como o etanol e o biodiesel, devido: à disponibilidade de terras agriculturáveis; à posição geográfica privilegiada, com clima favorável à agricultura; e à grande competitividade internacional que o setor sucroalcooleiro brasileiro apresenta, tanto na produção de açúcar, como na de álcool (Cinelli, 2012).

A batata-doce é uma matéria-prima com forte potencial para produção de hidrolisados, pois contém um alto teor de carboidratos na forma de amido. O amido da batata-doce, depois de hidrolisado à glicose, juntamente com outros açúcares redutores presentes na planta em quantidades menores, pode ser fermentado para a produção de etanol (Rizzolo *et al.*, 2012).

O pré-tratamento da biomassa e sua estrutura intrínseca são primariamente responsáveis pela sua subsequente hidrólise. As condições empregadas na escolha do método de pré-tratamento irão afetar as características do substrato, que, por sua vez, regulam a susceptibilidade do substrato para a hidrólise e a subsequente fermentação dos açúcares liberados (Kumar *et al.*, 2009).

A hidrólise química do amido é bastante utilizada no Brasil, em razão do seu baixo consumo energético e de químicos. O rendimento do processo é calculado sobre a quantidade usada de matéria-prima, mais comumente considerando a quantidade de amido que entrou no processo. O fracionamento do amido em cadeias menores é acompanhado pela adição de uma molécula de água (hidrólise) em cada ligação rompida (Sumerly *et al.*, 2003).

Assim como a mandioca, o sorgo e a cana-de-açúcar, a batata-doce possui as qualidades necessárias para ser utilizada como matéria-prima na produção de álcool. Não sendo muito exigente quanto à qualidade do solo, pode ser cultivada em terras semiáridas, sem prejudicar as plantações desta raiz voltadas à alimentação humana (Araújo, 1978).

A natureza produz cerca de 180 bilhões de toneladas anuais de biomassa renovável através da fotossíntese, dos quais 75% podem ser atribuídos à classe dos carboidratos. Destes, somente cerca de 4% é utilizado

pelo homem, o resto se decompõe e é reciclado por vias naturais (Lichtenthaler, 2007).

Os combustíveis oriundos da biomassa, como biodiesel e álcool, com a capacidade de substituir, em parte, os combustíveis veiculares, constituem uma outra inserção energética na Era do Petróleo. Outro fator muito considerado nos dias de hoje está relacionado às questões ambientais, na busca de produção de energia mais limpa para o ambiente, na perspectiva de promover o desenvolvimento sustentável (Souza, 2005).

A batata-doce é uma fonte alternativa para a produção de etanol no Brasil, levando outra opção de fonte de renda ao produtor rural, os quais representam 70% dos produtores de alimento nesse país.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas nesse estudo foram três variedades de nomes Amélia, Cuia e Rubissol foram cedidas pela Embrapa Clima Temperado-Pelotas/RS, mostradas na FIGURA 1.



FIGURA 1 - VARIEDADES DE BATATA-DOCE USADAS NO EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

### 2.2 Preparo da matéria prima

As batatas-doces utilizadas foram lavadas, cortadas em cubos de  $\pm 2,0$  cm de aresta, secas em estufa de circulação a  $60^{\circ}\text{C}$ , moídas, peneiradas e separadas em frações: fina  $\leq 0,8\text{mm}$  (47,9%), média 0,8 a 4,2mm (41,9%) e grossa  $\geq 4,2\text{mm}$  (10,2%). A fração usada nos experimentos foi a fração intermediária.

### 2.3 Análises Físico-químicas

As matérias-primas foram caracterizadas através de análises físico-químicas realizadas em triplicatas.

#### 2.3.1 Umidade

A umidade foi determinada através de secagem do material em estufa a uma temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$  até peso constante, a partir de 5g do material acondicionado em cadinhos.

### **2.3.2 Carboidratos**

Os carboidratos totais foram calculados por diferença, isto é, a partir das percentagens de umidade, proteína, lipídeos, cinzas e fibras (FDA e FDN) subtraídas de 100.

### **2.3.3 Proteínas**

Para obtenção dos teores de proteína foi utilizado o método Kjeldahl, baseado no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico e catalizador para a digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio. Adiciona-se NaOH concentrado e aquece-se para a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia. O borato de amônia formado é dosado com uma solução ácida (HCl) padronizada.

### **2.3.4 Lipídios**

A determinação de lipídios foi feita em extrator Soxhlet, utilizando éter de petróleo para extração. Foram pesados de 2 a 5g de amostra e colocados em um cartucho de celulose e posteriormente coberto com algodão desengordurado (para a gordura do algodão não interferir no resultado). O cartucho então foi colocado num extrator que ligado a um balão de coleta previamente pesado com éter de petróleo e junto com um condensador, formam o aparelho de Soxhlet. O sistema de aquecimento foi ligado e por refluxo intermitente a gordura foi retirada e fica misturada com o solvente no balão de coleta. O balão sofreu um processo de evaporação para eliminar o solvente e posteriormente colocado em estufa a 105°C para eliminar por completo qualquer traço de solvente que pudesse interferir na quantificação. Resfriou-se o balão em dessecador e pesou-se o balão com a gordura e por diferença foi encontrada a quantidade de gordura da amostra.

### **2.3.5 Fibras**

O teor de fibras foi determinado no equipamento Fiber Analyzer-Ankom220 (Ankom2000) pelo método de Van Soest. Neste método foram dosados os teores de lignina, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) determinados pelas metodologias de Van Soest (1967) e Van Soest e Wine (1967). Através desta metodologia com o uso do detergente neutro, ocorreu a solubilização do conteúdo celular da amostra, sendo o resíduo remanescente constituído de celulose, hemicelulose e lignina. Com o detergente ácido, o que se determinou foi a fibra em detergente ácido (FDA), que solubilizou o conteúdo celular e a hemicelulose, portanto, o restante foi formado por celulose e lignina. Enfim, a lignina foi determinada com a digestão das amostras em ácido sulfúrico 72%.

### **2.3.6 Cinzas**

Depois da determinação da umidade, os cadinhos com as amostras foram levados à mufla a 550°C, por 5 horas até queima completa da matéria orgânica, após esse período as amostras foram colocadas em dessecador, resfriadas e posteriormente pesadas.

### **2.3.7 Amido e açúcares solúveis**

Após realizada a hidrólise (tratamento ácido-térmico) utilizando ácido clorídrico, o pH foi neutralizado e as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman 42. Os açúcares totais foram quantificados em cromatógrafo líquido marca Shimadzu, equipado com coluna cromatográfica Aminex HPX-87-H, em forno com temperatura constante de 60°C. Foi utilizada fase móvel 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na vazão de 0,6 mL/min, detector de IR e volume de amostra no injetor de 20µL. Com padronização interna com padrão de maltose, glicose, frutose e etanol de 1 e 2 g/L. Nestas condições os tempos de retenção (minutos) de cada componente analisado foram: 8,14 para maltose, 9,8 para glicose e 10,7 para frutose.

O amido foi quantificado pela diferença entre os açúcares totais menos os açúcares solúveis presentes nas amostras.

As condições da hidrólise ácida foram definidas conforme estudo a seguir.

## **2.4 Processo de hidrólise-sacarificação**

A fim de hidrolisar o amido contido nas três variedades de batata-doce usadas no experimento, foram realizadas hidrólises termoquímicas das amostras, sendo realizada a otimização dos parâmetros testados por planejamento experimental. Tais testes foram realizados de acordo com metodologia de Woiciechowski *et al.* (2002), em que 2g do material seco e peneirado com umidade conhecida foram adicionados 50 mL de água destilada em frasco coberto com papel alumínio, amarrado com borracha elástica. As concentrações de ácido clorídrico (37%) estudadas foram de 0,5, 1,0 e 1,5% v/v. As temperaturas testadas foram 80, 100 e 120°C, com tempos de 5, 10 e 15 minutos. Resultados desses testes preliminares não serão mostrados.

A seguir, para as três variedades de batata-doce da Embrapa, foram testadas concentrações maiores de HCl de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 % v/v, sendo que o material foi submetido a tratamento térmico em autoclave em vapor fluente (100°C) ou pressurizada (120°C) pelo tempo desejado (15 minutos). Foi testada também uma condição de hidrólise com 7,5% v/v de HCl por 2h a 100°C, sendo esta última uma metodologia de acordo com Freitas *et al.* (1979) utilizada para quantificação de amido.

Após resfriamento do material até a temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 7,0 usando solução de hidróxido de sódio, e o volume foi completado com água destilada para 100 mL em balão volumétrico.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização da matéria-prima

Os resultados obtidos na caracterização das batatas-doces variedades Amélia, Cuia e Rubissol estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – ANÁLISE CENTESIMAL DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS *IN NATURA* EM PORCENTAGEM SOBRE BASE ÚMIDA

Componentes (%)	Amélia	Cuia	Rubissol
Umidade	64,5±0,5	58,63±0,35	58,19±1,61
Carboidratos	27,4	33,53	32,6
Açúcar solúvel	7,2±0,11	3,38±0,0	5,64±0,014
Amido	12,8	22,91	21,03
Proteínas	1,73±0,14	1,37±1,73	1,77±0,51
Lipídios	0,50±0,025	0,40±0,10	0,59±0,025
Cinzas	0,961±0,099	0,826±0,051	0,912±0,17
FDN	4,91	5,24	5,93
FDA	0,96	0,90	0,80

\*FDN: fibra detergente neutra

\*FDA: fibra detergente ácida

A determinação da umidade nas amostras estudadas foi um parâmetro importante a ser determinado, para que todos os resultados das análises subsequentes pudessem ser expressos em base seca. Além disso a umidade é um indicador útil para controlar o processo de secagem da matéria-prima.

As três variedades de batata-doce estudadas apresentaram valores de umidade menores do que os relatados na literatura para outras variedades: 70% (Woolfe, 1992), 71% (Bradbury, 1990) e 67% (Leonel e Cereda; 2002). Tais resultados das variedades Amélia e, principalmente, da Cuia e Rubissol são positivos, pois, num processo industrial resultaria em economia de energia e tempo no procedimento de secagem do material *in natura*, se necessário.

Quanto às fibras, foram observados maiores valores do que os reportados por outros autores: Leonel e Cereda (2002) apresentam 1,39 % de

fibra bruta em amostra de batata-doce; de acordo com Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-UNICAMP (2006) a batata-doce possui 2,6 % de fibras.

No presente estudo, foram quantificados 4,91; 5,24 e 5,93 % de FND nas batatas-doces Amélia, Cuia e Rubissol, respectivamente. Tais diferenças de valores de fibras são devido, provavelmente, à variações na composição das diversas variedades de batata-doce existentes, também em função do solo, clima, etc.

A composição química da batata-doce varia com a cultivar, condições climáticas, época da colheita, tratos culturais, duração e condições de armazenamento (Silva, 2002).

O conceito de fibra alimentar mudou consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, este conceito abrange uma gama muito mais ampla de substâncias do que se considerava anteriormente, englobando, além dos polissacarídeos não amiláceos, outros glicídios não digeríveis, como o amido resistente e oligossacarídeos não digeríveis. Atualmente, adotou-se a seguinte constituição: polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias vegetais associadas. Não existe, contudo, uma definição universalmente aceita de fibra alimentar tanto na Europa como no resto do mundo assim como não existe um só método analítico que permita determinar todos os componentes da fibra alimentar (Santos, 2013).

Portanto, os valores apresentados, de FDN e FDA, constituem apenas valores relativos às concentrações de hemicelulose e celulose, excluindo, possivelmente, a presença de outros compostos como substâncias não amiláceas, substâncias pécticas e ligninas.

Tais frações (substâncias não amiláceas, substâncias pécticas e lignina), juntamente com polissacarídeos (celulose-FDA e hemicelulose-FDN), amido, monossacarídeos e oligossacarídeos, ácidos orgânicos, fazem parte do conteúdo e da parede celular das plantas, constituindo assim os carboidratos totais das plantas.

Os valores obtidos para os carboidratos por diferença (26,4 %; 32,6 %; 31,8 %) respectivamente para as batatas-doces variedades Amélia, Cuia e Rubissol demonstraram ser os principais constituintes, estando em maior concentração, nas variedades Cuia a Rubissol, que os valores apresentados na

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-UNICAMP, em que a batata-doce contém 28,2 % de carboidratos totais.

Ziska *et al.* (2009), avaliaram a mandioca, a batata-doce e o milho como potenciais fontes de carboidratos para a produção de etanol. Contudo, relatam que as duas variedades de batata-doce estudadas, com 9,4 e 12,7 toneladas de carboidratos totais por hectare, têm maior potencial como fonte de etanol do que os sistemas existentes de milho, e como tal podem ser utilizadas para substituir ou compensar o milho como fonte de biocombustíveis.

Outro fator importante é a concentração de amido, uma vez que se trata do principal componente numa fermentação alcoólica depois, obviamente, de ser fragmentado à glicose, molécula acessível aos micro-organismos e à outros açúcares redutores. A quantificação do amido foi fundamental para o estabelecimento de todas as correlações mássicas e determinação do rendimento de hidrólise e eficiência de fermentação.

Foram testadas várias metodologias para a quantificação de amido de acordo com metodologias clássicas, já que usualmente os carboidratos são quantificados por diferença. Porém, os valores encontrados eram sempre menores que os encontrados nos estudo de hidrólises (mostrados no item a seguir). Em função desta constatação, considerou-se o valor encontrado na melhor condição de hidrólise o valor real, consistindo assim uma metodologia adaptada para matéria-prima em questão.

Fez-se a subtração dos açúcares solúveis presentes nas variedades Amélia, Cuia e Rubissol (7,2; 3,38 e 5,64 % respectivamente) obtendo-se 12,8; 22,91 e 21,03 % de amido, respectivamente.

Zhang *et al.* (2011), analisando a produção de etanol a partir da batata-doce, obtiveram 23,91% de amido, valores próximos aos quantificados nas variedades Cuia e Rubissol. Já para açúcares solúveis os autores encontraram 9,32 %, aproximando do valor de açúcares solúveis da Amélia.

Jin *et al.* (2012) estudaram dez variedades de batata-doce a fim de avaliar suas performances quanto à produção de etanol e encontraram valores de açúcares totais que variaram de 15,89 a 36,04 %, mostrando a diversidade das taxas de açúcares que se pode encontrar em diferentes variedades dessas raízes.

Proteínas e lipídios apresentaram valores acima dos valores mostrados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011), que apresenta estes parâmetros na faixa de 1,3 e 0,1 %, respectivamente. Mesmo não sendo relevante para o presente estudo, nota-se que as variedades adquiridas na Embrapa são mais ricas em termos nutricionais. Já a concentração de cinzas foi similar à concentração apresentada na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-UNICAMP.

### **3.2 Processo de Hidrólise-sacarificação**

A batata-doce, na granulometria selecionada para o presente experimento (0,8 a 4,2mm), foi submetida ao processo de hidrólise ácida para disponibilizar em fase líquida o polissacarídeo hidrolisado, basicamente amido, presente na fase sólida. A hidrólise consiste em submeter o material sólido a um tratamento térmico por tempos definidos, em meio ácido para possibilitar a hidrólise. As condições físicas de hidrólise foram otimizadas, com o objetivo de determinar a melhor concentração do ácido usado, a temperatura e o tempo de hidrólise que possibilitassem a melhor recuperação de açúcar, ou seja, a maior concentração de açúcar redutor no meio após tratamento térmico.

Os resultados das hidrólises para cada uma das três variedades de batata-doce estudadas estão apresentados nos GRÁFICOS 1, 2 e 3 a seguir, com as duas temperaturas aplicadas de 100°C (2,0; 3,0; 4,0 e 7,5 % de HCl v/v) e 120°C (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 % de HCl v/v) por 15 minutos, com exceção do tratamento com 7,5% de HCl v/v que foi de 2 horas.

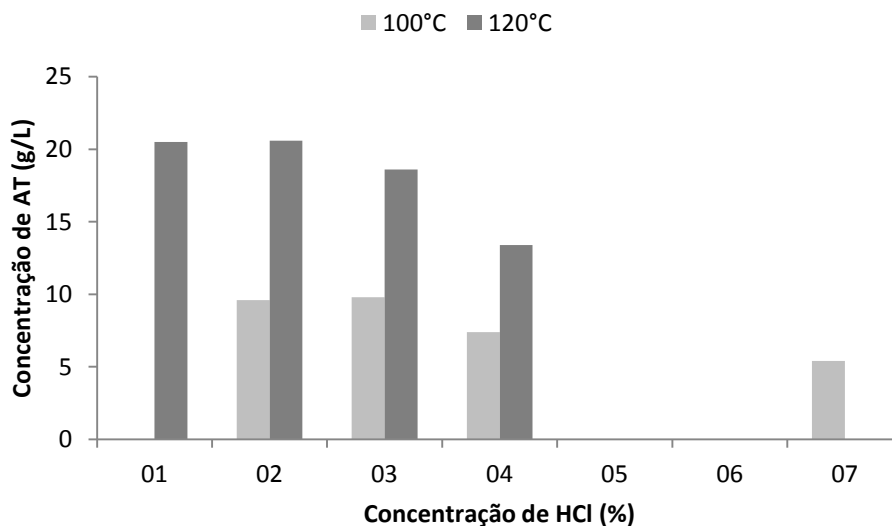


GRÁFICO 1 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE AMÉLIA, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HCL (V/V), SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS

Os açúcares redutores totais na condição de 1,5% de HCl v/v a 100°C não foram analisados, em nenhuma das três variedades de batata-doce estudadas, pois de acordo com estudos anteriormente realizados (dados não mostrados), observou-se que, abaixo dessas condições, a sacarificação teria menor rendimento, o que não é de interesse para o presente estudo. Por isso aplicou-se a temperatura de 100°C para concentrações acima de 1,5% de HCl v/v.

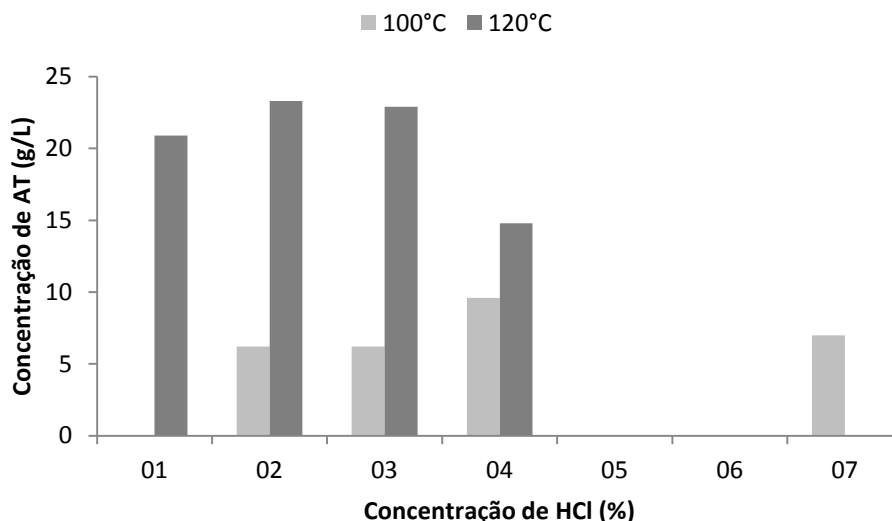


GRÁFICO 2 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE CUIA, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HCL (V/V), SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS

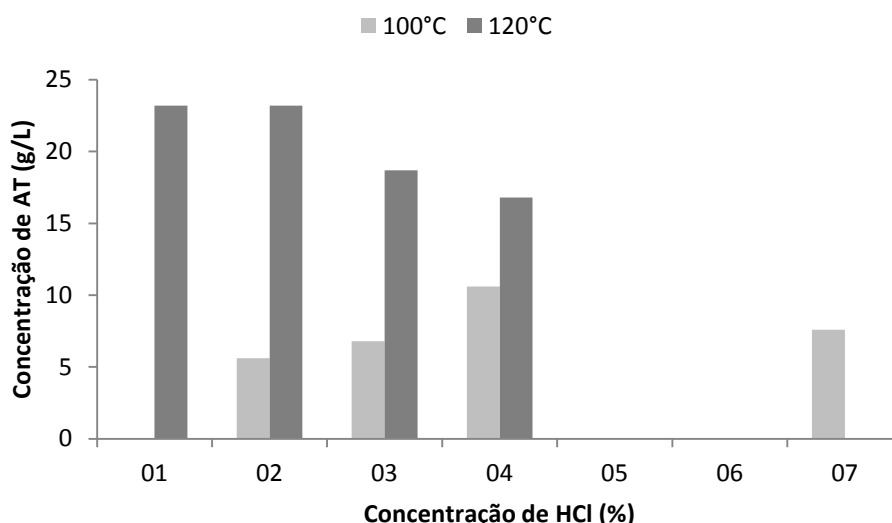


GRÁFICO 3 - AÇÚCARES TOTAIS NOS HIDROLISADOS DA VARIEDADE RUBISSOL, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HCL (V/V), SUBMETIDOS A 100°C E 120°C POR 15 MINUTOS. \* TRATAMENTO TÉRMICO POR 2 HORAS

De acordo com os resultados apresentados nos gráficos, as hidrólises mais expressivas, que produziram hidrolisados com maiores concentrações de açúcares, foram aquelas com temperatura mais elevada (120°C), como verificado por Ribeiro *et al.* (2009). O autor obteve melhores resultados, estudando hidrólise do amido da batata-doce, quando diminuiu a concentração de HCl, de 10% v/v, por 2h e 49 minutos para 0,5% v/v por 45 minutos, porém elevou a temperatura de 97 para 127°C.

Todas as três variedades de batata-doce estudadas apresentaram um comportamento similar, indicando grandes diferenças nos valores de Açúcares Totais nos hidrolisados em virtude das concentrações de ácido e, principalmente, das temperaturas avaliadas (100°C e 120°C).

As tabelas a seguir apresentam os rendimentos das hidrólises (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 % HCl v/v, a 120°C, por 15 minutos) em relação à concentração dos açúcares redutores e totais presentes nos hidrolisados e nas amostras das batatas-doces Amélia, Cuia e Rubissol.

Os rendimentos das hidrólises foram calculados utilizando como referência de 100% de rendimento os próprios valores encontrados no ensaios, pois, nenhuma outra condição incluindo metodologias padrão e tradicionais não foram adequadas para quantificar o amido presente nas amostras estudadas (dados não apresentados). Tais metodologias utilizam concentrações próximas a 3% ou 7,5% de HCl v/v com proporções de massa/volume até menores da que foi aplicada nos ensaios aqui apresentados, o que, no presente estudo foi evidenciado como concentrações de ácido muito altas que acabam, provavelmente, degradando açúcares mostrando-se inadequadas.

TABELA 3 - RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE AMÉLIA COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS

[HCl] (%)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	AT (g/L)	Rendimento (%)
1,5	4,3	11	5,2	20,5 ± 2,19	99,51
2,0	2,5	12,8	5,3	20,6 ± 1,27	100
2,5	1,5	11,5	5	18 ± 1,41	87,38
3,0	0,5	13,0	5,1	18,6 ± 0,99	90,29
3,5	0	12	4	16 ± 1,41	77,67
4,0	0	11,4	2	13,4 ± 1,56	65,05

TABELA 4 - RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS

[HCl] (%)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	AT (g/L)	Rendimento (%)
1,5	4,9	11,2	4,8	20,9 ± 1,34	89,70
2,0	4,5	13,9	4,9	23,3 ± 1,91	100
2,5	4,3	12,9	3,9	21,1 ± 1,34	90,56
3,0	3	16,2	3,7	22,9 ± 2,19	98,28
3,5	2	12,8	2,7	17,5 ± 0,35	75,11
4,0	1	12,8	1	14,8 ± 0,42	63,52

TABELA 5 - RENDIMENTO DAS HIDRÓLISES DA BATATA-DOCE VARIEDADE RUBISSOL COM RELAÇÃO AOS AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, SUBMETIDOS A 120°C POR 15 MINUTOS

[HCl] (%)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	AT (g/L)	Rendimento (%)
1,5	4,7	13,4	5,1	23,2 ± 0,42	100
2,0	4,3	13,8	5,1	23,2 ± 1,98	100
2,5	2	14,2	5,1	21,3 ± 1,20	91,81
3,0	1	13,2	4,5	18,7 ± 0,92	80,60
3,5	0	13,1	4	17,1 ± 0,64	73,71
4,0	0	15,3	1,5	16,8 ± 0,85	72,41

Nos testes com as variedades Amélia e Rubissol, quando aplicadas as concentrações de 3,5 e 4,0% v/v de HCl, a 120°C, foram detectadas nas análises de açúcares em HPLC, apenas glicose e frutose. A maltose provavelmente foi totalmente hidrolisada como pode-se perceber sua redução com o aumento da concentração do ácido clorídrico.

As concentrações de glicose tiveram pouca variação com o aumento da concentração do HCl, apresentando as maiores concentrações com 3,0% de HCl v/v (Amélia e Cuia) e com 4,0% de HCl v/v na Rubissol. Porém os melhores rendimentos foram com as concentrações de ácido de 1,5 e 2% v/v pois a partir de 2,5% v/v os valores de frutose e maltose começaram a diminuir, resultando numa menor concentração de Açúcares Totais finais.

Nas condições com temperatura de 100°C todos os açúcares foram detectados, porém a hidrólise não foi eficiente, houve uma hidrólise parcial do amido e de outros polissacarídeos hemicelulósicos como consequência da baixa temperatura, mesmo utilizando concentrações de HCl altas (2,0; 3,0 e 4,0% v/v), e a condição de 100°C, mas não foi eficiente, pois a recuperação de açúcares foi menor do que com 4,0% de HCl v/v.

Na condição com 7,5% de HCl (v/v) a 100°C, por 2h, somente a glicose, ainda que em baixa concentração, foi detectada nas análises de açúcares, indicando que houve degradação dos três açúcares redutores presentes nas variedades estudadas. Deste modo a utilização de tal método não seria adequado para quantificação dos açúcares totais das matérias-primas em questão.

Portanto as melhores condições de hidrólise foram as que utilizaram 1,5 e 2,0% de HCl a 120°C, pois apresentaram os maiores rendimentos e

preservaram a glicose, a frutose e a maltose, importantes açúcares fermentescíveis, constituindo assim as condições que gerariam menos custos para o processo, utilizando menos ácido clorídrico e menos solução básica para neutralização do pH.

#### 4. Conclusão

De acordo com as análises centesimais, pode-se sugerir que a quantidade de carboidratos totais indica que as três variedades de batata-doce estudadas apresentam potencial como matéria-prima para produção de etanol.

O presente estudo alcançou seus objetivos, verificando e adaptando as metodologias de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise ácida de amido da batata-doce.

Diferenças estruturais e de composição entre variedades e espécies de amiláceos existem, exigindo mudanças nas condições de hidrólise. Foi encontrada uma condição de hidrólise utilizando uma menor concentração de ácido clorídrico (1,5 % v/v) do que a bibliografia relata, indicando um processo viável economicamente para a indústria.

Como nos hidrolisados obtidos foram identificados açúcares simples como glicose, frutose e maltose mas preferencialmente glicose, este caldo pode ser fermentado facilmente a etanol.

A produção de etanol combustível, a partir do hidrolisado do amido da batata-doce, indica ser uma alternativa viável para o desenvolvimento do setor energético brasileiro e de importância relevante como alternativa de renda para pequenas e médias propriedades rurais, permitindo a implantação de unidades de produção de etanol de pequeno porte para atender às necessidades locais em pequenas comunidades.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, N. Q.; *et al.* **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol.** [s.l], 1978.

BRADBURY, J.H. Chemical composition of tropical roots crops and its implication for nutrition. In: **Eighth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops**, Bangkok, cap 3, p. 51, 1990.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**, Rio de Janeiro, 183 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FREITAS, R.J.S.; DAHER, A.L.K.; SANTOS, M.A.B.; TIBONI, E.B.; CECATO, E. **Técnicas Analíticas de Alimentos.** Tecpar: Curitiba, p. 114, 1979.

KUMAR P.; BARRETT D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P.. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res**, 48, p. 3713–3729, 2009.

JIN, Y., FANG, Y., ZHANG, G., ZHOU, L., ZHAO, H. Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages. **Acta Oecologica**, p. 1-5, 2012.

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

LICHTENTHALER, F. W. Carbohydrates as renewable Raw materials: a major Challenge of green Chemistry. **Methods and Reagents for Green Chemistry: An introduction**, 2007.

RIBEIRO, N.; GODINHO, A.M.M.; MARQUES, T.A. Produção de glicose a partir do amido da batata-doce por hidrólise ácida. **Colloquium Agrariae**, Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Presidente Prudente, v. 5, n.especial, p. 244-247, 2009.

RIZZOLO, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Estudos de diferentes condições de hidrólises ácidas da batata-doce para produção de etanol. **7º Congresso de Bioenergia**, São Paulo-SP, 2012.

SANTOS, J. R. Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas. Lisboa, 63 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v. 2, cap. 22, p. 448-505, 2002.

SOUZA, A. F. B. C. **Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce**. Palmas, 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SURMELY, R. *et al.* Hidrólise do Amido. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v. 3, cap.15. p. 377-395, 2002.

Universidade Estadual de Campinas. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), 2006.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. **IV Determination of plant cell-wall constituents**, 157, 1967.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-120, 1967.

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n. 3, 2002.

WOOLFE, J. A. **Sweet potato: an untapped food resource**. Cambridge University Press, 188 p. 1992.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, V. 102, p. 4573-4579, 2011.

ZISKA, L. H., RUNION, G. B., TOMECEK, M., PRIOR, S. A., TORBET, H. A., SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland, **Biomass and Bioenergy**, 33, p. 1503-1508, 2009.

## CAPÍTULO II – ESTUDOS PARA A DEFINIÇÃO DE CULTIVAR DE BATATA-DOCE E CEPA DE LEVEDURA PARA O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

### Resumo

O baixo custo de produção, a rusticidade do cultivo, o alto potencial produtivo e o valor alimentício da batata-doce são fatores relevantes para sua utilização, principalmente na agricultura familiar. No Brasil, a cultura da batata-doce é produzida tradicionalmente por pequenos produtores, cujo principal objetivo é o auto-consumo, além do destino para alimentação animal, indústria de amido, farinhas e etanol. Ainda existe um grande espaço para o crescimento da cultura, uma vez que muitas tecnologias estão sendo desenvolvidas e podem ser aplicadas nessa cultura. O alto teor de amido presente na batata-doce aliado à alta produtividade em toneladas por hectare e a escolha de um microrganismo de alta performance fermentativa podem tornar a produção de etanol a partir da batata-doce uma forte alternativa ao etanol derivado do caldo de cana-de-açúcar. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar três variedades de batata-doce e quatro cepas de leveduras a fim de definir qual a melhor combinação para produção de etanol. Para isso foram realizadas fermentações com *Saccharomyces cerevisiae* isolada (fermento de pão industrializado) com as três variedades de batata-doce (Amélia, Cuia e Rubissol). Após definida a variedade da batata-doce, foram feitas fermentações com os quatro micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*). Os ensaios foram feitos com caldo hidrolisado a partir da batata-doce seca, moída, granulometria definida, na proporção de 15% m/v, com pH 5,0, a 30°C em estufa, com uma concentração de inóculo de  $10^7$  células/mL. Amostras foram coletadas a cada 6 horas por um período de 24 horas e analisados os açúcares consumidos e o etanol produzido por cromatografia líquida. A variedade de batata-doce Cuia foi a mais promissora para produção de etanol, apresentando 8979,7 L/ha/ano em dois ciclos anuais e 71,9% de eficiência de fermentação. A cepa que apresentou melhor performance no processo foi a *Saccharomyces cerevisiae* alcançando 10579,8 L/ha/ano. A produção de etanol a partir da batata-doce é uma vantajosa alternativa à cana-de-açúcar pois possui dois ciclos por ano, promovendo nova fonte de renda sustentável para famílias rurais e pequenas comunidades.

## 1. Introdução

O abastecimento insuficiente de energia tornou-se um grande desafio para o desenvolvimento sustentável no Brasil, especialmente pela dependência do petróleo e pelos longos períodos de estiagem que estão acontecendo atualmente.

Dois fatos importantes têm influenciado fortemente o mercado de álcool: os altos preços do petróleo e as questões ambientais. Os maiores consumidores mundiais de derivados de petróleo têm buscado opções de abastecimento com outros combustíveis, notadamente os renováveis, cujos processos produtivos foram viabilizados pelos altos preços do petróleo. Além disso, as questões ambientais passaram a se sobrepor às econômicas em função da necessidade de redução das emissões de gases de efeito estufa na atmosfera, de modo a reduzir o processo de aquecimento global (Ventorim, 2008).

A batata-doce é uma matéria-prima com forte potencial para produção de hidrolisados sacarificados, pois contém um alto teor de carboidratos na forma de amido. O amido, polissacarídeo facilmente hidrolisável da batata-doce, depois de hidrolisado à glicose, juntamente com outros açúcares redutores presentes na célula vegetal em quantidades menores, pode ser fermentado para a produção de etanol (Rizzolo *et al.*, 2012).

Uma fermentação alcoólica envolve micro-organismos que utilizam açúcares como alimento no processo. Esses micro-organismos podem tipicamente usar os açúcares com 6 carbonos, sendo um dos mais comuns a glicose. Entretanto, a escolha do microrganismo apropriado para tal função é de importância fundamental para o êxito da fermentação.

As leveduras são os micro-organismos mais largamente utilizados para a produção de etanol. As linhagens devem possuir certos requisitos como velocidade de fermentação, resistência ao etanol, eficiência de conversão do açúcar em etanol, resistência ao pH e antissépticos e estabilidade genética (Pacheco, 2010).

Muitas espécies de levedura são usadas para produzir etanol, algumas amplamente utilizadas, como *Saccharomyces cerevisiae*, e outras como

*Saccharomyces boulardii*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*. Todas essas espécies de levedura são abeis para fermentar açúcares simples a etanol (Mancilha *et al.*, 1984; Hägerdal *et al.*, 1991; McMillan *et al.*, 1993; Ballesteros *et al.*, 2004; Zafar e Owais, 2006; Limtong *et al.*, 2007; Rodrigues, 2012).

Assim como existe uma preocupação com a escolha dos micro-organismos a serem utilizados para a produção de etanol, a variedade de uma cultura também influencia na eficiência do processo. Existe uma grande diferença nos valores de produtividade entre as variedades de batata-doce.

Segundo Silva (2002), a média brasileira encontra-se abaixo de 10 toneladas por hectare, não alcançando uma competitividade com outras matérias-primas. Por outro lado, percebe-se que o índice de produtividade tem sido crescente nos últimos anos, revelando que o sistema de produção tem sofrido mudanças que indicam uma evolução do nível tecnológico.

Silveira *et al.* (2002), indicam uma melhora no processo de seleção de batata-doce com produtividade entre 30 a 65 t/ha, indicando uma superioridade desses novos clones de batata-doce entre 154 e 400% em relação à produtividade obtida na década de 70, quando se iniciaram pesquisas com essa cultura para produção de álcool combustível.

Castro e Emygdio (2008) relatam que a Embrapa Clima Temperado dispõe de 51 acessos de batata-doce isentos de enfermidades. Alguns desses acessos produzem entre 30 e 60 toneladas por hectare.

O ciclo da produção da batata-doce (6 meses) é mais curto do que o da cana-de-açúcar (12 a 18 meses), mas são, sem dúvida, as vantagens econômicas e ambientais do cultivo da hortaliça que mais chamam atenção na produção de álcool etílico para combustível e álcool fino para a indústria farmacêutica (Neto, 2010). A batata-doce apresenta cultivo pouco exigente, em dois ciclos anuais, pode ser cultivada em áreas degradadas e possui alta concentração de amido.

A combinação dos baixos custos de produção da batata-doce com o desenvolvimento de variedades com alta produtividade, associados a um processo microbiano adequado, fazem com que a produção de etanol a partir da batata-doce seja competitiva com a produção a partir do milho (Ziska *et al.*, 2009).

Segundo Silveira (2006), as principais características para que a cultura se torne uma opção real no programa brasileiro de bioenergia são: elevada produtividade, alto teor de matéria seca, resistência a insetos de solo e doenças.

Contudo, no presente estudo as variedades de batata-doce utilizadas apresentaram produtividades de 32 t/ha, 50 t/ha e 40 t/ha para Amélia, Cuia e Rubissol, respectivamente, produtividades essas maiores do que a média nacional com 11 t/ha.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Agente da fermentação alcoólica

Os primeiros ensaios de fermentação foram realizados com levedura isolada de fermento industrializado de pão da marca Fleischman, adquirido em comércio local utilizando as três variedades de batata-doce (Amélia, Cuia e Rubissol).

Após esses testes preliminares foram utilizadas quatro cepas de levedura disponíveis no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR-LPB (*Saccharomyces cerevisiae* - LPB1-93, *Saccharomyces boulardii*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*) com a variedade de batata-doce que se mostrou com melhores rendimentos nos estudos preliminares com fermento de pão comercial.

### 2.2 Fermentação alcoólica

O caldo para os ensaios fermentativos foi preparado com 150 g de batata-doce seca/L (15% m/v) a fim de aumentar a concentração de açúcares no meio.

A hidrólise da batata-doce foi realizada conforme condições otimizadas no Capítulo I (1,5% HCl v/v, a 120°C, por 15 minutos), porém diferindo na proporção de batata-doce adicionada (15% m/v). A seguir, o caldo foi diluído quando concentrações de açúcar inicial mais baixas eram requeridas, pois três diferentes concentrações de açúcar inicial foram estudadas.

Os ensaios foram feitos com caldo filtrado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de caldo. O caldo teve seu pH ajustado para 5,0, foi adicionado anti-espumante e o meio foi esterilizado a 120°C por 15 minutos. Logo após, para dar início a fermentação, o inóculo na concentração de  $10^7$  células por mL foi adicionado ao caldo/meio de fermentação.

As fermentações foram conduzidas em estufa a 30°C por 24 horas, em duplicata, sendo que amostras foram coletadas de 6 em 6 horas a fim de analisar em HPLC os açúcares consumidos e o etanol produzido, para o acompanhamento da fermentação.

O inóculo foi preparado em meio YM – peptona (5 g/L), extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L) e dextrose (10 g/L), em shaker a 30°C, com agitação de 120 rpm, por 24 horas.

### 2.3 Análise dos ensaios de fermentação

Para analisar a performance das fermentações quanto ao consumo de açúcar e produção de etanol, as amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida, em cromatógrafo marca Shimadzu, equipado com coluna cromatográfica Aminex HPX-87-H, em forno operando a 60°C. Foi utilizada fase móvel 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na vazão de 0,6 mL/min e detector de IR com padronização interna com padrão de maltose, glicose, frutose e etanol de 1 e 2 g/L. Nestas condições os tempos de retenção de cada componente analisado foram os mesmos mencionados no Capítulo I, item 2.3.7, porém com a adição do padrão de etanol com tempo de retenção (minutos) de 23,1.

### 2.4 Cálculo da Eficiência da Fermentação (EF)

A eficiência das fermentações foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$EF = \frac{Ef - Ei}{(ATi - ATf) \cdot 0,511} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que EF (%), Ef, Ei, ATi, ATf são as concentrações (g/L) de etanol final e inicial (Ef e Ei) e açúcar total inicial e final (ATi e ATf), de cada fermentação.

A partir de 1 g de glicose, uma conversão completa ocorrerá quando for produzido 0,511 g de etanol e 0,49g de CO<sub>2</sub>, por isso o açúcar consumido deve se multiplicado por 0,5111 como representado na Equação 1.

### 2.5 Cálculo da Produtividade do Etanol (PE)

A produtividade do etanol em litros por hectare das fermentações foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$P = \frac{(Ep) \cdot AT_{ha}}{(ATc)} \cdot 1000 \cdot 0,84 \quad \text{Equação 2}$$

Onde P é a produtividade do etanol em L/ha, Ep é o etanol produzido na fermentação (g/L), o AT<sub>ha</sub> é o valor de açúcar total presente em 1 hectare da variedade de batata-doce (tonelada), AT<sub>c</sub> é o açúcar total consumido durante a fermentação (g/L). O resultado é multiplicado por 1000 para obter o valor em hectare e multiplicado por 0,84 que é a densidade do etanol.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Fermentação com levedura isolada de fermento de pão comercial utilizando as variedades Amélia, Cuia e Rubissol, de batata-doce hidrolisada

A fermentação das três variedades de batata-doce foi realizada com leveduras isoladas de fermento de pão para avaliar a melhor conversão dos açúcares em etanol. As três concentrações de açúcar estudadas e as variáveis analisadas estão apresentadas nas TABELAS 7, 8 e 9.

Todos os cálculos foram desenvolvidos de acordo com a concentração de AT/ha e com a produtividade de cada variedade (Amélia, Cuia e Rubissol) assim como mostra a TABELA 6.

TABELA 6 - PRODUTIVIDADE EM T/HA E AT EM T/HA DAS TRÊS VARIEDADES DE BATATA-DOCE ESTUDADAS (AMÉLIA, CUIA E RUBISSOL)

Variedades de batata-doce	Produtividade (t/ha)	AT (t/ha)
Amélia	32	6,4
Cuia	50	13,14
Rubissol	40	10,66

As tabelas apresentadas a seguir mostram as performances das fermentações das três variedades de batata-doce estudadas, utilizando leveduras isoladas de fermento de pão como agente fermentativo. Os tempos de fermentação apresentados nas tabelas são de 18 e 24 horas, a fim de comparar as variáveis analisadas em relação a esses dois tempos de fermentação.

TABELA 7 - PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE AMÉLIA EM 18 E 24 HORAS

Tempo (horas)	18	24	18	24	18	24
Açúcar Total inicial (g/L)	36,1	36,1	43,2	43,2	63,2	63,2
Etanol inicial (g/L)	1	1	1,1	1,1	1,6	1,6
Açúcar Total final (g/L)	4,32	4,05	14,25	1,1	12	9,2
Etanol final (g/L)	14,3	12,2	5,25	4,85	8	17,2
Açúcar Total consumido (g/L)	31,78	32,05	28,95	42,1	51,2	54
Etanol produzido (g/L)	13,3	11,2	4,15	3,7	6,4	15,6
Eficiência da Fermentação (%)	82	68,5	28	17,4	24,5	56,6
Produtividade (L/ha)	2199,1	2068,2	771,1	478,3	672	1555,6
Produtividade (L/ha) 2 ciclos	4398,2	4136,4	1542,2	956,9	1344	3111,1

Com 36,1 g/L de concentração inicial de açúcares totais, a glicose foi totalmente consumida em 18 horas, e foi atingida também a produção de etanol mais elevada (13,3 g/L) no mesmo tempo de fermentação. Em 24 horas, a produção de etanol caiu, como apresentado na TABELA 7 e só restaram maltose e frutose, em pequena concentração.

Para os testes com 43,2 g/L de concentração inicial em açúcar, também foi alcançada produção de etanol mais elevada (4,1 g/L) em 18 horas em relação à produção obtida em 24 horas. Mas foi baixa a conversão do açúcar a etanol, assim, esta fermentação não teve um desempenho adequado, apresentando 17,4 % de eficiência da fermentação nas 24 horas.

Usando 63,2 g/L de concentração inicial em açúcar, a produção de etanol foi maior (15,6 g/L) do que as outras concentrações de açúcares estudadas, também atingindo seu melhor desempenho em 24 horas porém a eficiência de fermentação foi baixa.

A eficiência da fermentação na primeira condição, com 36,1 g/L de açúcar inicial e 18 horas de fermentação, foi a mais elevada quando foi usada a batata-doce variedade Amélia (68,5 %), e teve a mais alta produtividade considerando dois ciclos de produção por ano, atingindo 4398,2 L de etanol/ano.

A TABELA 8 a seguir demonstra a performance fermentativa da batata-doce variedade Cuia quanto à produção de etanol.

TABELA 8 - PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA EM 18 E 24 HORAS

Tempo (horas)	18	24	18	24	18	24
Açúcar Total inicial (g/L)	33,6	33,6	59,6	59,6	82,8	82,8
Etanol inicial (g/L)	1,8	1,8	1,6	1,6	1,8	1,8
Açúcar Total final (g/L)	4,6	4,1	9	4,8	23,6	10,8
Etanol final (g/L)	13	13,8	19,2	17	21,7	28
Açúcar Total consumido (g/L)	29	29,5	50,6	54,8	59,2	71,9
Etanol produzido (g/L)	11,2	12	17,6	15,4	19,8	26,2
Eficiência da Fermentação (%)	75,6	70	68,2	57,9	65,6	71,4
Produtividade (L/ha)	4262,8	4489,9	3839,1	3101,8	3691,6	4019,3
Produtividade (L/ha) 2 ciclos	8525,6	8979,7	7678,3	6203,6	7383,2	8038,5

Na primeira concentração de açúcar estudada (33,6 g/L) a glicose foi consumida em 18 horas e a produção de etanol (11,2 g/L) foi muito similar a máxima alcançada em 24 horas (12 g/L). Este valor foi bem próximo ao valor encontrado na fermentação da batata-doce variedade Amélia. Porém, usando a batata-doce variedade Cuia, obteve-se um maior produtividade (4489,9 L/ha) do que a batata-doce variedade Amélia (2068,2 L/ha) porque a variedade Cuia tem uma produtividade no campo de aproximadamente 50 t/ha e a variedade Amélia 32 t/ha, ainda que as duas tenham alcançado uma eficiência na fermentação muito similar nessa condição.

Com a segunda concentração de açúcar da Cuia (59,6 g/L), a produção de etanol alcançou valores máximos em 18 horas (15,4 g/L) e com 82,8 g/L de concentração de açúcar inicial foi atingida uma produção de 26,2 g/L de etanol em 24 horas.

A TABELA 9 apresenta a performance da Rubissol com todos os parâmetros da fermentação.

TABELA 9 - PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO DO TRATAMENTO TÉRMICO-QUÍMICO COM A BATATA-DOCE VARIEDADE RUBISSOL EM 18 E 24 HORAS

Tempo (horas)	18	24	18	24	18	24
Açúcar Total inicial (g/L)	34,3	34,3	55	55	76,2	76,2
Etanol inicial (g/L)	1,8	1,8	2,7	2,7	2,5	2,5
Açúcar Total final (g/L)	2,02	2,02	3,4	4	7,75	5
Etanol final (g/L)	10,7	12,3	14,2	21,2	23,75	30
Açúcar Total consumido (g/L)	32,28	32,2	51,6	51	68,45	71,2
Etanol produzido (g/L)	8,9	10,5	11,5	17,6	21,25	27,5
Eficiência da Fermentação (%)	54	63,9	43,7	67,6	60,8	82,6
Produtividade (L/ha)	2466,5	2823,1	1993,7	3247,1	2777,2	3458,7
Produtividade (L/ha) 2 ciclos	4933	5646,1	3987,5	6494,2	5554,5	6917,4

A maior eficiência da fermentação com o hidrolisado obtido com a batata-doce variedade Rubissol foi com 76,2 g/L de concentração de açúcar (82,6 %), com uma produtividade do etanol de 3458,7 L/ha, representando o melhor resultado para essa variedade.

Em todas as fermentações alcoólicas, a glicose foi consumida quase completamente nas 18 horas. Com as variedades Cuia e Rubissol foram obtidos os melhores resultados de fermentação de 71,4 e 82,6 % de eficiência de produção do etanol, a partir da fermentação com 33,6 e 76,2 g/L de concentração de açúcar, respectivamente. As maiores produtividades dessas mesmas variedades foram 8979,7 e 6917,4 litros de etanol/ano, respectivamente, considerando duas safras da batata-doce por ano.

Portanto, a batata-doce variedade Cuia foi escolhida para continuação dos estudos. O fator mais importante para essa escolha foi a alta produtividade dessa variedade (50 t/ha).

Fermentando o caldo de cana-de-açúcar pode-se atingir cerca de 7000 L/ha de etanol por ano, com apenas um ciclo por ano, contudo, a batata-doce variedade Cuia mostrou uma excelente fonte de açúcar para produção de etanol, podendo alcançar uma produtividade máxima de 6704 L/ha ou 13408 L/ha quando todo o açúcar disponível na variedade for convertido em etanol, considerando, nesse último caso, as duas safras de batata-doce por ano. Porém, ainda são necessários melhoramentos no processo de fermentação para conseguir eficiência próxima de 90-100 %, isso significa obter 51 g de etanol e 49 g de CO<sub>2</sub> a partir de 100 g de açúcar.

A glicose produz partes aproximadamente iguais de dióxido de carbono e etanol e ainda libera energia. Parte da energia é usada para o metabolismo celular e parte é perdida na forma de calor. Esta relação, porém, ignora que parte da glicose será destinada para o crescimento da levedura e que existem outros metabólitos produzidos (Russel, 2003). Por isso não é possível um rendimento fermentativo de 100% de conversão dos açúcares à etanol.

### **3.2. Fermentação do hidrolisado obtido da batata-doce variedade Cuia com quatro cepas de levedura disponíveis no LPB**

De acordo com os resultados obtidos anteriormente, a batata-doce variedade Cuia foi escolhida para continuar os experimentos com quatro cepas diferentes, a fim de avaliar a capacidade fermentativa das mesmas e encontrar as melhores condições de fermentação com o microrganismo mais promissor para a produção de etanol a partir de batata-doce como substrato.

Duas concentrações iniciais de açúcar foram utilizadas neste estudo (~ 45 g/L, ~ 70 g/L), com as mesmas condições de fermentação (pH, temperatura, concentração de inóculo e período de tempo), previamente aplicadas nos estudos já descritos.

A FIGURA 2 mostra o consumo de três açúcares presentes no hidrolisado obtido (glicose, maltose e frutose) e a produção de etanol, durante 24 horas de fermentação com as quatro cepas estudadas.

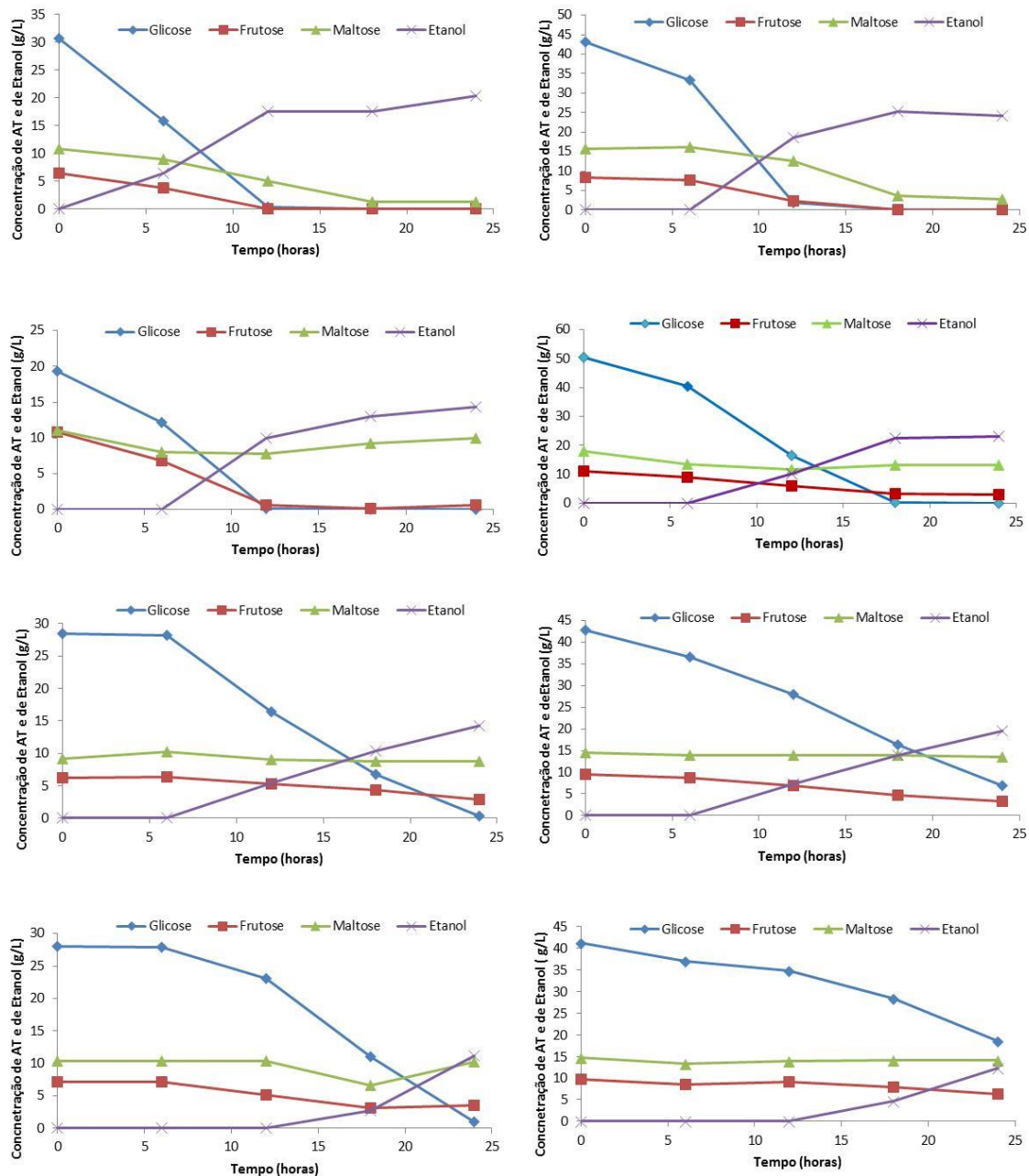


FIGURA 2 - CONSUMO DOS AÇÚCARES TOTAIS E PRODUÇÃO DE ETANOL COM *Saccharomyces cerevisiae* (A-B), *Saccharomyces boulardii* (C-D), *Candida tropicalis* (E-F) E *Kluyveromices marxianus* (G-H) SOB DUAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR APLICADAS PARA CADA CEPA

Para a menor concentração de açúcar (gráfico, A, C, E, G), a glicose foi rapidamente consumida a partir das 6 horas, restando menos do que 1 g/L. A maltose foi consumida com menor velocidade do que a glicose e a frutose.

Nota-se que, para a maior concentração de açúcar total (~ 70g/L), a *Saccharomyces cerevisiae* foi a única espécie que conseguiu consumir frutose, maltose e glicose e apresentou a maior taxa de produção de etanol.

*Saccharomyces boulardii* apenas consumiu glicose e *Candida tropicalis* e *Kluyveromices marxianus* não consumiram toda a glicose e produziram as menores concentrações de etanol.

A eficiência de fermentação (EF) foi avaliada de acordo com o etanol produzido a partir do açúcar total utilizado para cada cepa. A TABELA 10 mostra a performance da fermentação em 24 horas e a produção de etanol em litros por ano, considerando-se duas safras por ano da batata-doce.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DAS QUARTO DIFERENTES CEPAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. boulardii</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>K. marxianus</i>	
AT i	44,2	67,4	41,2	79	43,8	66,9	45,5	65,6
Ep	20,8	24,2	14,4	23	14,2	19,6	14,5	12,3
EF	93,9	73,4	89,1	71,4	87,2	89,1	93,1	90,6
Ac	98	94	76	79	72,8	64,4	67,8	40,5
PE	10579,8	8269,7	10027,9	8046,4	9826,6	10038,8	10483	10207,7

AT=Açúcar Total (g/L), Ep=Etanol produzido (g/L); EF=eficiência da fermentação (%); Ac=Açúcar consumido (%); PE=Produtividade do Etanol (L/hectare/ano)

A fermentação com a *Saccharomyces cerevisiae* apresentou a maior utilização de açúcares de 98%, com 44,2 g/L e 94% com 67,4 g/L de concentração de açúcar total. Esta cepa obteve adequadas eficiências de fermentação também (93,9 e 73,4%), mostrando uma capacidade de consumir açúcar e produzir etanol a partir do hidrolisado obtido da batata-doce variedade Cuia.

Na fermentação alcoólica, os principais produtos obtidos são etanol e dióxido de carbono, em que 100 g de glicose produzem 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono, o rendimento máximo teórico de 51,1% dado na eficiência de conversão de base. A eficiência da fermentação (EF) foi calculada em função do etanol produzido em relação aos açúcares consumidos e foi muito semelhante em concentrações mais baixas de açúcar, perto de 90%. Nas maiores concentrações de açúcar houve uma diminuição na eficiência da fermentação quando foram usadas a *S. cerevisiae* e a *S. boulardii*.

*S. boulardii* e *C. tropicalis* apresentaram uma produção de etanol adequada. *K. marxianus* apresentou uma produtividade competitiva porém com baixo consumo de açúcar nas duas situações estudadas (67,8 e 40,5 %).

Singh *et al.* (2014) estudaram a produção de etanol a partir da casca de arroz hidrolisado por *S. cerevisiae* e obtiveram 14 g/L de etanol, a partir de 70 g/L de açúcar inicial com 30% de eficiência e 51,4% de açúcar consumido.

Cardona *et al.* (2014) obtiveram 15,1 g/L de etanol, com uma concentração de açúcares redutores de 34,4 g/L, após 24 horas de fermentação, estudando a produção de etanol a partir de capim-elefante, utilizando *S. cerevisiae*.

Ambos os estudos de produção de etanol citados acima apresentaram valores inferiores aos obtidos no presente estudo, ainda que tenham utilizado o mesmo microrganismo e concentrações iniciais de açúcar semelhantes, porém com diferente matéria-prima, indicando que a batata-doce pode vir a ser uma fonte de carbono adequada para produção de etanol.

A batata-doce é usada principalmente para alimentos processados, alimentação animal e matéria-prima para a produção de etanol. A hortaliça também tem uma eficiência de biomassa elevada. A produtividade média de batata-doce fresca é 13 – 33 toneladas/ha, e o teor de amido da batata-doce fresca é de cerca de 18 – 30%. Com a tecnologia atual, cerca de 8 toneladas de batata-doce fresca podem produzir 1 tonelada de etanol (Qiu *et al.*, 2010).

De acordo com relatórios de avaliação da safra de 2013 da UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar), a produção de cana de açúcar em 2012/13 foi de 74 t/ha, e com uma perspectiva para 2013/14 de 80-82 t/ha, com um ciclo por ano.

Alternativamente, batata-doce tem dois ciclos de cultura por ano, dobrando a produção de etanol. Outro fator importante que tem uma grande influência na produção de etanol (L/ha) é a produtividade em toneladas por hectare, o que muda muito dependendo da variedade da cultura, tornando inviável ou não a produção de etanol.

Levando em conta que a batata-doce variedade Cuia pode produzir 134 L de etanol por tonelada, considerando uma produtividade de 50 t/ha e 26,29 % do total de açúcar, resultando em 6704 L de etanol/ha ou 13.408 L/ha/ano, *S. cerevisiae* atingiu o maior valor de etanol em L/ha/ano, e um maior consumo dos açúcares totais, indicando ser a cepa mais adequada à produção de etanol.

Isso sugere que estudos futuros são necessários para encontrar uma cepa com melhor eficiência de fermentação alcoólica e tolerância a altas concentrações de açúcar.

#### 4. Conclusão

A batata-doce variedade Cuia foi a variedade eleita para os próximos estudos pois forneceu os melhores resultados no processo fermentativo, alcançando valores de até 8979,7 L/ha/ano, sendo assim os maiores valores de produtividade de etanol em litros por hectare por ano alcançados.

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* foi a cepa escolhida para dar seguimento aos estudos em função de sua maior adaptação aos açúcares presentes no caldo hidrolisado de batata-doce, consumindo mais de 90 % dos açúcares disponíveis.

A desvantagem do processo é que a batata-doce para ser usada como substrato para a fermentação alcoólica, deve passar por tratamento térmico para gelatinização e/ou hidrólise do amido, exigindo uma etapa a mais de processamento; assim, estudos de viabilidade econômica são necessários para avaliar o processo.

## REFERÊNCIAS

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J; MANZANARES P. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 108751. **Process Biochemistry**, 39, p. 1843-1848, 2004.

CARDONA E.; RIOS J.; PEÑA J.; RIOS L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, 118, 41–47, 2014.

CASTRO, L.A.S.; EMYGDIO, B.M. Batata-doce com potencial para produção de biocombustível. **Acesso Genéticos**, EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS. p. 2, 2008.

HÄGERDAL, H.B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanolic Fermentation of Pentoses in Lignocellulose Hydrolysates. **Applied Microbiology**, 1991.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, 98, p. 3367-3374, 2007.

MANCILHA, I.M.; PEARSON, A. M.; MOMOSE, H.; PESTKA, J.J. Technical Note Increasing Alcohol Yield by Selected Yeast Fermentation of Sweet Sorghum. II. Isolation and Evaluation of Mutants and Wild Types for Ethanol Production. **Food Chemistry**, 14, p. 313-318, 1984.

MCMILLAN, J. D. **Xylose fermentation to ethanol: a review**. National Renewable Energy Laboratory, A Division of Midwest Research Institute Operated for the U.S. Department of Energy, 1993.

NETO, A. C. G. **Aptidões para consume humano, produção de etanol e alimentação animal em clones de batata-doce**. Lavras, 78 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais, 2010.

PACHECO T. F. **Fermentação com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia, 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

QIU, H.; HUANGA, J.; YANGA, J.; ROZELLE, S.; ZHANG, Y.,.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy, **Applied Energy**, 87, p. 76-83, 2010.

RIZZOLO, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Estudos de diferentes condições de hidrólises ácidas da batata-doce para produção de etanol. **7º Congresso de Bioenergia**, São Paulo-SP, 2012.

RODRIGUES, M. Q. R. B. **Expressão heteróloga de celulases em Kluyveromyces marxianus para utilização em bioprocesso consolidado na produção de etanol celulósico**, Viçosa, 121 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Viçosa, Minas Gerais, 2012.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). *The Alcohol Textbook. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: UK: Nottingham University Press, 2003.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v. 2, cap. 22, p. 448-505, 2002.

SILVEIRA, M. A. *et al.* Resistência de clones de batata-doce coletados no Estado do Tocantins a insetos de solo e nematóides causadores de galhas. **Horticultura Brasileira**. v. 20, n. 2, 2002.

SILVEIRA, M. A.; TAVARES, I. B.; ANDRÉ, C. M. G. *et al.* Seleção de acessos de batata-doce obtidos via programa de melhoramento genético visando à produção de etanol no Estado do Tocantins. In: **Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre-PUC/ABES-RS. 19 p. 2006.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, 116, p. 699–702, 2014.

ÚNICA <http://www.unica.com.br/noticia/32026594920320868796/unica-revisa-projecao-para-safra-2012-por-cento2F2013-por-cento2C-aponta-moagem-maior-por-cento2C-mas-queda-na-producao-total-de-acucar-e-etanol-no-centro-sul/>

VENTORIM, F.; MACHADO, G. Álcool Combustível na Matriz Energética Brasileira. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

ZAFAR, S.; OWAIS, M. Short communication Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Engineering Journal**, 27, p. 295-298, 2006.

ZISKA, L. H., RUNION, G. B., TOMECEK, M., PRIOR, S. A., TORBET, H. A., SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland, **Biomass and Bioenergy**, 33, p. 1503-1508, 2009.

### **CAPÍTULO III – ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA USANDO COMO SUBSTRATO A BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA E A CEPA DE *Saccharomyces cerevisiae* LPB1-93**

#### **Resumo**

O Brasil é um país com alta produtividade e competitividade na obtenção de etanol, mas ainda busca a implementação de tecnologias novas e alternativas, visando à sustentabilidade e independência da energia fóssil. A produção de etanol a partir da batata-doce pode trazer benefícios à agricultura familiar, promovendo oportunidade para o desenvolvimento de pequenas usinas de etanol e, por essa razão, a batata-doce torna-se matéria-prima alternativa no contexto de biocombustíveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* LPB1-93 quanto ao desempenho na produção de etanol frente a vários aspectos como gelatinização, fonte de nitrogênio, fermentação do caldo com os sólidos da batata-doce, aumento de escala, destilação do etanol e análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV), utilizando a batata-doce variedade Cuia. Assim, foi realizada a gelatinização do amido em autoclave a 120°C por 15 minutos, após a fermentação simultânea à sacarificação, até 84 horas. A fim de reduzir etapas do processo, foi realizada e avaliada a hidrólise e esterilização simultâneas. Foi testado extrato de levedura como fonte de nitrogênio em diferentes concentrações (0, 4, 6 e 10 g/L). Foi realizada a destilação do etanol, análise de compostos orgânicos voláteis (COV) e balanço de massa da fermentação com aumento de escala. Os resultados mostraram que com a gelatinização foi possível eliminar a etapa de hidrólise ácida, porém foi obtida baixa concentração de açúcar no caldo. As eficiências das fermentações de 5L com caldo filtrado (FL-Fermentação Líquida) e não filtrado (FSS-Fermentação Semi-Sólida) apresentaram valores próximos. Não houve diferença significativa na eficiência de produção de etanol entre as concentrações de fontes de nitrogênio utilizadas. Foi identificada a presença de COV na amostra destilada, indicando a possibilidade de se desenvolver uma aguardente a partir da batata-doce variedade Cuia. O balanço de massa indicou que a partir de 1kg de batata-doce variedade Cuia foi possível obter 204,6 mL de etanol. Os estudos mostraram bons resultados, indicando a não necessidade de se fazer a complementação com fonte adicional de nitrogênio o que favorece a redução de despesas no processo de produção de etanol a partir da batata-doce.

## 1. Introdução

A demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido de forma rápida nos últimos anos e deverá acelerar ainda mais em um futuro próximo, devido a diversos fatores como a necessidade de redução da dependência de derivados de petróleo nas matrizes energéticas nacionais e mundiais, incentivo à agricultura e às indústrias locais, desenvolvimento de estratégias para a redução e limitação do volume de emissões de gases causadores do efeito estufa e o uso de matérias primas renováveis, produzidas por fotossíntese, o carbono verde.

A batata-doce é uma matéria-prima com forte potencial para produção de hidrolisados sacarificados, pois contém um alto teor de carboidratos na forma de amido. O amido da batata-doce, depois de hidrolisado a glicose, juntamente com outros açúcares redutores presentes na raiz da planta em quantidades menores, pode ser fermentado para a produção de etanol (Rizzolo *et al.*, 2012).

A combinação dos baixos custos de produção da batata-doce, o desenvolvimento de variedades com alta produtividade e um processo microbiano adequado, faz com que a produção de etanol a partir da batata-doce seja competitiva com a produção a partir do milho (Ziska *et al.*, 2009).

Fermentação é uma simples conversão biológica do açúcar a etanol e dióxido de carbono. As matérias-primas para a produção de etanol são moléculas de açúcares simples, como a glicose ou a frutose, encontradas na maioria das frutas (Sachs, 1980). Pela estequiometria, para 1g de glicose metabolizada, são produzidos 0,511g de etanol e 0,489g de gás carbônico (Souza, 2005).

As leveduras são os micro-organismos mais largamente utilizados para a produção de etanol. As linhagens devem possuir certos requisitos como velocidade de fermentação, resistência ao etanol, eficiência de conversão do açúcar em etanol, resistência ao pH e antissépticos e estabilidade genética (Pacheco, 2010).

Em termos nutricionais, uma pequena quantidade de oxigênio deve ser provida ao processo fermentativo como um componente necessário para a síntese de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados pela levedura, caso

contrário, o excesso de oxigênio promoverá o crescimento celular às custas da produtividade de etanol (Ferreira, 2010).

A reprodução de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta mais significativa (Pinotti, 1991). Entretanto, a capacidade fermentativa da levedura diminui sob condições com excesso de nitrogênio (Thomas, 1996).

Não somente fatores microbianos que influenciam numa fermentação alcoólica são importantes para o sucesso de um processo. Outras questões presentes no preparo da matéria-prima como a utilização ou não de ácidos para hidrolises, a busca por redução de etapas, insumos e, conseqüentemente, de custos, influenciam nas escolhas de elaboração de pesquisas na área e na aplicação industrial.

## **2. Material e Métodos**

Com o microrganismo (*Saccharomyces cerevisiae*) e a variedade de batata-doce (Cuia) selecionados previamente, deu-se seguimento a alguns testes para tentar reduzir insumos, tempo e etapas do processo e aumentar a escala da hidrólise e da fermentação.

### **2.1 Gelatinização do amido presente na batata-doce e fermentação do caldo gelatinizado**

Para a etapa de gelatinização do amido presente na batata-doce variedade Cuia, o caldo foi preparado com 150 g/L de batata-doce na granulometria média e foi tratado por 15 minutos a 120°C, sem o ácido clorídrico.

A fermentação seguiu metodologia já descrita no Capítulo II.

Amostras foram coletadas de 12 em 12 horas num total de 84 horas, a fim de analisar os açúcares consumidos e etanol produzido em HPLC seguindo metodologia descrita no item 2.3 do Capítulo II.

### **2.2 Fermentação Semi-sólida (FSS)**

A fim de eliminar uma etapa do processo (filtração ou centrifugação) do preparo do caldo a ser fermentado, a hidrólise foi realizada nas condições definidas de acordo com Capítulo II, porém o caldo não foi filtrado e posteriormente esterilizado. Logo após a correção do pH do caldo, já foi realizada a inoculação e iniciada a fermentação com os sólidos no meio. A variedade de batata-doce utilizada a partir desse item foi sempre a Cuia, selecionada de acordo com Capítulo II.

### **2.3 Testes fermentativos com adição de fontes de nitrogênio**

Foram testadas diferentes concentrações de extrato de levedura como fonte de nitrogênio (0, 4, 6 e 10 g/L) a fim de avaliar uma eventual melhora na eficiência da fermentação quanto à produção de etanol. As condições da

fermentação e de análise foram as mesmas das descritas nos itens 2.2 e 2.3 do Capítulo II.

#### **2.4 Aumento da escala de fermentação com Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS)**

Para realizar os testes de aumento de escala de fermentação foi preparado um caldo (hidrolisado) filtrado e posteriormente autoclavado (condições definidas e apresentadas no Capítulo II) e um outro caldo com sólidos, ou seja, sem filtrar e esterilizado juntamente com a hidrólise, esse último, de acordo com metodologia do item 2.2 do capítulo presente. Porém, a partir desse experimento, foram usadas as três frações da batata-doce (fina, média e grossa).

Para esse experimento foi feita uma adaptação na metodologia de hidrólise: ao invés da hidrólise ser conduzida por 15 minutos, ela foi conduzida em duas etapas de 10 minutos, para que no intervalo entre as duas etapas fosse feita uma homogeneização do meio para desmanchar possíveis aglomerados de batata-doce devido ao seu maior volume utilizado com o aumento de escala.

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 6 litros com 5 litros de meio, nas mesmas condições das fermentações já apresentadas (item 2.2, Capítulo II) assim como as coletas e análises das amostras.

#### **2.5 Destilação dos caldos da Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS)**

Os caldos das fermentações Líquida e Semi-sólida de 5 L foram peneirados e filtrados para remoção de células de levedura e dos sólidos da batata-doce, quando presentes.

Após esse processo de separação do material sólido, o caldo passou por um processo de destilação do etanol em um sistema de destilação tradicional, com manta aquecedora Fisatom classe 300, modelo 202, balão de fundo redondo com capacidade de 2000mL e adaptador e condensador tipo reto.

A medição do grau alcoólico das frações destiladas foi realizada com alcoômetro a 20°C.

O princípio da destilação se baseia na diferença entre o ponto de ebulição da água (100°C) e do etanol (78,4°C), o que permite separar o álcool.

## **2.6 Balanço de massa do processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia com a cepa LPB1-93 e caldo hidrolisado não filtrado (FSS)**

Considerou-se a massa de batata-doce seca que entra no processo como 750 g, presente nos 5 litros de caldo filtrado (15% m/v), o pré-tratamento com HCl 1,5% v/v, o etanol produzido (em g/L e em volume).

## **2.7 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis**

Após o período de destilação, os Compostos Orgânicos Voláteis presentes no destilado foram analisados em cromatógrafo gasoso a fim de verificar a presença dos mesmos.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GC17A e equipado com coluna HP-DB 5 (30 m x 0,32 mm) e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230 °C. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40°C durante 5 minutos, sendo aumentada a uma taxa de 20°C/min até a temperatura final de 150 °C, que foi mantida durante 4 minutos. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio a uma vazão de 1,5 mL/min, e uma taxa de *split* de 1:5.

As amostras foram mantidas em estufa a 40°C por 40 minutos, em seguida amostras do “*headspace*” foram retiradas por meio de uma seringa própria para gases.

Padrões usados e seus respectivos tempos de retenção (minutos): acetato de etila 2,67; 3-metil-1-butanol 4,48; 1-decanol 12,706; ácido caprílico 13,310; decanoato de etila 14,636.

## **2.8 Análise da vinhaça obtida na destilação do fermentado**

A fim de verificar a possibilidade de um aproveitamento da vinhaça em futuros estudos e validá-la com um subproduto de valor agregado, foram realizadas as seguintes análises da vinhaça produzida na destilação dos caldos das Fermentações Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS): sólidos totais suspensos, condutividade, N amoniacal, dureza, sódio, cálcio, potássio, magnésio, ferro, manganês e cobre. Todas essas análises foram realizadas pelo LACTEC Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Gelatinização do amido presente na batata-doce e fermentação do caldo gelatinizado

A gelatinização envolve o rompimento das pontes de hidrogênio entre e dentro das moléculas de amido, permitindo a hidratação e a hidrólise enzimática da molécula. O processo de gelatinização é tipicamente realizado com aquecimento em meio aquoso na temperatura adequada (90 a 100°C), ou, alternativamente, com o uso de uma base (hidróxido de potássio) seguida por uma neutralização. Sendo que uma incompleta gelatinização pode levar a uma incompleta hidrólise do amido à glicose (Zanine *et al.*, 2006). Shariffa *et al.* (2009) relataram a temperatura de gelatinização do amido da batata-doce de 74,2°C.

O processo de gelatinização torna o amido acessível às enzimas. Pode ser aplicado a fim de evitar o uso de ácido para hidrólises, porém é necessária a presença de enzimas produzidas pelos micro-organismos e tempo para que as mesmas possam atuar adequadamente, por isso optou-se uma fermentação de 84 horas, acompanhada de análises em amostras coletadas ao longo deste tempo.

A seguir a TABELA 11 mostra os estudos de fermentação do caldo previamente gelatinizado, utilizando a batata-doce variedade Cuia, com as concentrações de açúcar total (AT) e etanol em g/L.

TABELA 11 - PERFORMANCE DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA QUANTO AO ETANOL PRODUZIDO, EM g/L, DA FERMENTAÇÃO COM CALDO GELATINIZADO, UTILIZANDO A BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA

Tempo (h)	AT (g/L)	Etanol (g/L)
0	31,4	1
12	15,4	6,6
24	4,5	10,3
36	1,4	11
48	1,2	11,8
60	1,2	12
72	1,1	11,3
84	1	11,2

Devido à ausência do ácido clorídrico no preparo do caldo, a concentração de açúcar inicial ficou baixa (31,4 g/L) em relação às concentrações obtidas quando foi utilizado o HCl para hidrolisar o amido presente nas batatas-doces (capítulos anteriores).

Nota-se que em 36 horas de fermentação com a batata-doce variedade Cuia, os açúcares já tinham praticamente sido consumidos e o etanol produzido (11 g/L) já tinha alcançado valores perto de sua máxima concentração (12 g/L), indicando que seria desnecessário esperar mais 24 horas de fermentação (36 até 60 horas) para se obter mais 1,0 g/L de etanol, equivalente a 8,3 % a mais de etanol.

A gelatinização do amido da batata-doce variedade Cuia não se mostrou adequada, pois não houve um aumento dos açúcares no caldo com o passar das horas, e na fermentação houve somente o consumo dos açúcares simples solúveis, provavelmente em função da deficiência de enzimas próprias para tal função de hidrolisar o amido residual tornando os açúcares acessíveis ao microrganismo.

Entretanto, com o uso de ferramentas de biologia molecular, faz-se possível a construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de crescer com o amido como principal fonte de carbono, através da introdução de genes de amilases (Cinelli, 2012).

### **3.2 Hidrólise e esterilização simultânea- Fermentação Semi-sólida**

A fim de reduzir uma etapa no processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia (selecionada no capítulo anterior), foi realizada uma fermentação com os sólidos da batata-doce no meio, ou seja, não foi feita a filtração do caldo após hidrólise.

A TABELA 12 mostra a performance da fermentação em relação ao consumo de açúcar e produção de etanol, nos tempos de 0, 12, 18 e 24 horas.

TABELA 12 - CONSUMO DE AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE ETANOL (g/L) DA FERMENTAÇÃO COM CALDO NÃO FILTRADO DA VARIEDADE DE BATATA-DOCE CUIA

Tempo (h)	AT (g/L)	Etanol (g/L)
0	92,4	2,4
12	75,9	11,25
18	45,3	20,2
24	17	27,3

Com base nos resultados da fermentação apresentados na TABELA 12 pode-se destacar que a eficiência da fermentação (Y) foi de 74,1%, com uma produtividade de 4965,8 L/ha de etanol (duas safras por ano) em 18 horas, sendo que somente metade do AT tinha sido consumido, restando ainda 45,3 g/L de AT.

Em 24 horas de fermentação obteve-se uma eficiência de 64,8% e uma produtividade de 3586,5 L/ha de etanol, ambos valores menores que os obtidos em 18 horas, considerando também duas safras da variedade por ano, porém com um aumento na concentração de etanol de 26 %.

### 3.3 Testes fermentativos com adição de fonte de Nitrogênio

Todos os caldos fermentescíveis utilizados até o momento nos estudos não tiveram adição de nutrientes, pois se optou por redução de custos. Entretanto, a fim de verificar se ocorreria um aumento da produção do etanol, foram testadas três concentrações de fonte de nitrogênio utilizando extrato de levedura. A FIGURA 3 mostra a performance das fermentações alcoólicas aplicando as crescentes concentrações de extrato de levedura.

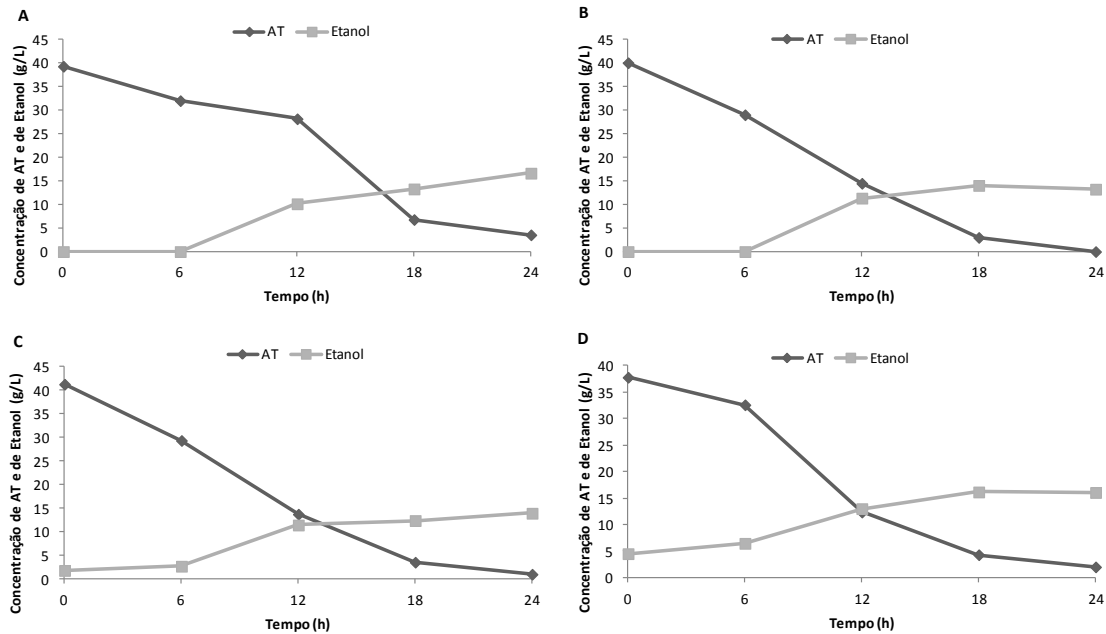


FIGURA 3 - PERFORMANCE DAS FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA 0, 4, 6 E 10 g/L (GRÁFICOS A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE, UTILIZANDO-SE O HIDROLISADO DE BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA E COM *S. Cerevisiae* LPB1-93

A primeira condição apresentada (gráfico A), sem fonte de nitrogênio, foi a que apresentou melhor desempenho quanto à produção de etanol, com eficiência da fermentação de 91,23% em 24 horas. Nas outras condições (4, 6 e 10 g/L de extrato de levedura) as eficiências de fermentação foram de 70,17%, 67,5% e 63,28%, respectivamente (gráficos B, C e D).

Já Malta (2006), estudando parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça, encontrou os melhores fatores de conversão de substrato em células quando adicionou extrato de levedura na concentração de 9 g/L.

Pode ter ocorrido, quando adicionado extrato de levedura ao caldo, um crescimento microbiano mais rápido do que quando não adicionada fonte de  $N_2$ .

No ensaio sem o extrato de levedura, 90,9% do açúcar foi consumido e com as posteriores concentrações de fonte de  $N_2$  (4, 6 e 10 g/L) 100%, 98% e 94% dos açúcares foram consumidos, respectivamente. Portanto, mesmo com um maior consumo de açúcar, os ensaios utilizando fonte de  $N_2$  tiveram seu desempenho menor quando comparado ao ensaio onde não fez uso de tal fonte. Provavelmente, no caso dos ensaios com extrato de levedura, o

metabolismo microbiano pode ter se voltado ao consumo de açúcar, multiplicação celular, produção de outros compostos e não propriamente à produção de etanol.

A variação entre as eficiências de fermentação alcoólica no presente experimento não foi significativa a ponto de se tornar indispensável a utilização de uma fonte de nitrogênio, pois houve pouca influência das diferentes concentrações de extrato de levedura na eficiência de fermentação alcoólica. Portanto, optou-se por não fazer uso de nutrientes adicionais (extrato de levedura) nos caldos a serem fermentados.

### 3.4 Aumento da escala de fermentação com Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS)

A fim de verificar o desempenho da fermentação em uma maior escala e também a influência da presença dos sólidos no caldo em maior escala, foram realizados ensaios com 5 litros de caldo hidrolisado da batata-doce variedade Cuia filtrado (FL) e não filtrado (FSS).

As TABELAS 13 e 14 a seguir mostram o consumo dos açúcares presentes nos caldos e a produção de etanol no decorrer de 18 horas de fermentação.

TABELA 13 - PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO COM 5 LITROS DE CALDO HIDROLISADO FILTRADO (FL) DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA COM A CEPA *S. cerevisiae* LPB1-93

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)
0	12,1	27	12,2	51,3	1,1
6	12,2	20,3	10,3	42,8	4,1
12	12,1	6	4,9	23	14,1
18	9	0	2,3	11,3	21,4

TABELA 14 - PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO COM 5 LITROS DE CALDO HIDROLISADO NÃO FILTRADO (FSS) DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA COM A CEPA *S. cerevisiae* LPB1-93

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)
0	16,4	38	10,4	64,8	1
6	15,4	31,6	8,2	55,2	4
12	14,8	4,2	4,1	23,1	22,2
18	2,5	0,5	1	4	32

Nota-se que para um caldo que não foi diluído, as concentrações iniciais de açúcar estão um pouco baixas, principalmente no caldo da FL . Isso ocorreu em função da hidrólise não completa do amido da batata-doce variedade Cuia. Como foi utilizada uma massa grande de pó de batata-doce (750 g/5L), comparada à utilizada nos ensaios anteriores (22,5 g/150mL), o sólido tendeu a ficar com uma menor mobilidade, reduzindo assim a eficiência da hidrólise, indicando a necessidade de agitação intermitente do material durante o tratamento térmico e hidrólise e não somente como foi feito (duas etapas de 10 minutos com homogeneização entre as duas etapas).

Campelo *et al.* (2009) relatam ocorrência similar estudando a hidrólise ácida da fécula de mandioca e do mesocarpo de babaçu com problemas na obtenção de altas concentrações de açúcar, devido ao reator utilizado ser desprovido de agitação mecânica, o que pode ter acarretado uma queda no rendimento da hidrólise devido a limitações e à transferência de massa. Ademais a agitação mecânica poderá diminuir o tempo reacional além de evitar a sedimentação do material no fundo do reator como observado, principalmente, com o amido de babaçu.

Quanto à influência do aumento da escala e da presença ou não dos sólidos, nos meios na eficiência das fermentações, pode-se notar que o comportamento de consumo dos açúcares e produção de etanol foi similar aos ensaios em menor escala , possibilitando ampliação da fermentação e eliminação do processo de filtração.

As duas fermentações acima foram conduzidas até 18 horas pois nesse momento a glicose já tinha sido consumida, a frutose estava quase esgotada e a maltose pouco havia sido consumida na fermentação com caldo filtrado e na fermentação com caldo não filtrado já estava bastante baixa. Também porque em 18 horas obteve-se 99% de eficiência da fermentação do etanol (calculada de acordo Equação 1 do item 2.4 do Capítulo II), nas duas fermentações.

### **3.5 Destilação dos caldos da Fermentação Líquida (FL) e Semi-sólida (FSS)**

Para que se obtivesse o produto em questão, o etanol, foi realizada a destilação dos fermentados de 5L filtrado (FL) e não filtrado (FSS) devido ao maior volume.

Durante o processo de destilação notou-se a presença de aroma agradável no produto, por isso foi feita a coleta de amostras para posterior análise desses compostos aromáticos.

O volume destilado foi 515 mL (29° GL) do volume total de caldo fermentado adicionado no destilador (4,4 L), originando 3885 L de vinhaça. Parte do volume total inicial de 5 litros foi reduzido na filtração (sólidos úmidos), na retirada de amostras e pequenas perdas durante o processo todo de destilação.

### **3.6 Balanço de massa do processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia com cepa LPB1-93 e caldo hidrolisado não filtrado (FSS)**

A FIGURA 4 apresenta o balanço de massa do processo de produção de etanol da batata-doce variedade Cuia a partir da fermentação com 5 litros de caldo não filtrado, com 64,8 g/L de açúcar inicial e 31 g/L de etanol final.

O balanço de massa foi calculado somente da FSS pois a mesma apresentou uma maior concentração inicial de AT e de etanol final, resultando assim num maior volume de produto destilado.

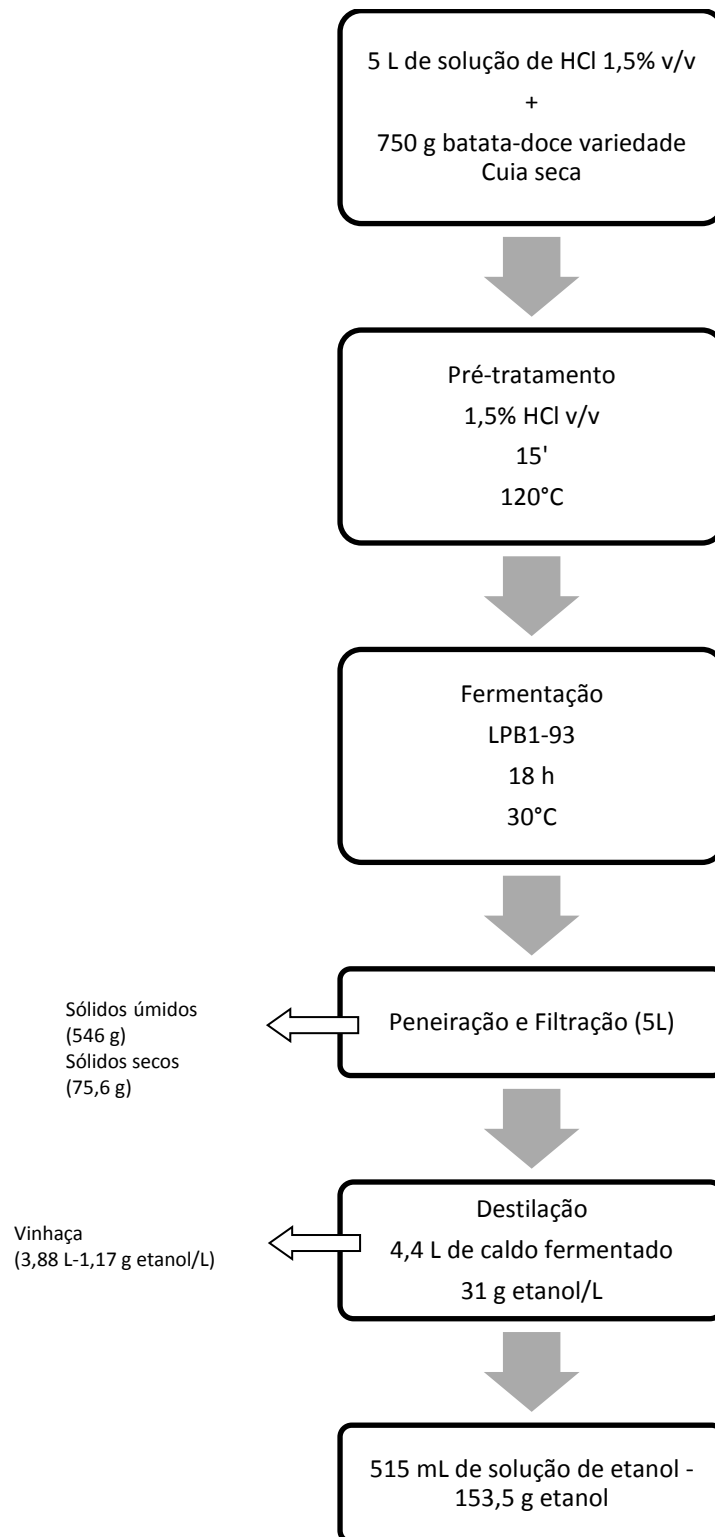


FIGURA 4 - BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA DA FERMENTAÇÃO DE 5 L (FSS), COM A CEPA LPB1-93

O balanço de massa do processo de produção de etanol da batata-doce variedade Cuia a partir da fermentação com 5 litros de caldo não filtrado (FSS) indica que a partir de 750 g da matéria-prima em questão, pode-se obter 153,5

g de etanol puro. Analisando o balanço de massa teórico, 155 g de etanol puro devem ser obtidos nessa condição experimental (750 g de batata-doce/5 L). Essa diferença entre o balanço de massa real e o teórico deve-se à pequena perda de etanol que permaneceu na vinhaça (1,17 g/L) e outras pequenas perdas durante o processo de destilação.

Portanto se considerar uma quantidade inicial de 1 kg de batata-doce variedade Cuia para a produção de etanol, nessas mesmas condições de pré-tratamento, de concentração inicial de açúcar, de fermentação, de rendimento de etanol e destilação, pode-se obter 204,6 mL de etanol puro.

### **3.7 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis**

A fim de verificar e qualificar a presença de Compostos Orgânicos Voláteis, amostras das frações destiladas do experimento do item 3.4 foram analisadas em Cromatógrafo Gasoso.

Foram identificados compostos comumente encontrados em cachaças e aguardentes, citados a seguir com suas respectivas características aromáticas: acetato de etila (frutal, doce), 3-metil-1-butanol (frutado de banana, alcoólico), ácido caprílico (ceroso, seboso, desejável em algumas cervejas) e decanoato de etila (frutado de maçã e de uva).

A presença de tais COV's indica a possibilidade de desenvolver uma aguardente de excelente qualidade, em relação a compostos aromáticos, a partir da fermentação com a batata-doce variedade Cuia.

### **3.8 Análise da vinhaça obtida na destilação da FL e FSS**

As vinhaças obtidas na destilação dos fermentados de 5L (Fermentação Líquida e Fermentação Semi-sólida) foram caracterizadas a fim de encontrar potenciais aplicações para as mesmas.

A TABELA 15 mostra a caracterização dessas vinhaças obtidas após destilação dos caldos fermentados.

TABELA 15 - CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA 1 (FL) E DA VINHAÇA 2 (FSS) DAS FERMENTAÇÕES DE 5 L

	Vinhaça 1	Vinhaça 2
Sólidos totais suspensos	289 mg/L	23260 mg/L
Condutividade	17 $\mu$ S/cm	17 $\mu$ S/cm
N de amônia total	6,71 mg/L	10,82 mg/L
Dureza	0,3 mg/L CaCO <sub>3</sub>	0,3 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Sódio	1680 mg/L	1525 mg/L
Cálcio	<0,05 mg/L	<0,05 mg/L
Potássio	725 mg/L	540 mg/L
Magnésio	<0,05 mg/L	<0,05 mg/L
Ferro	<0,05 mg/L	<0,05 mg/L
Manganês	<0,01 mg/L	<0,01 mg/L
Cobre	<0,01 mg/L	<0,01 mg/L

Uma forma em que se pode utilizar vinhaça é sua aplicação em cultivos hidropônicos de algumas hortaliças. Santos *et al.* (2013), estudando a aplicação da vinhaça de cana para aplicação em cultivos hidropônicos de alface, agrião e rúcula, desenvolveu uma solução com 10% de vinhaça para que os nutrientes ficassem dentro da faixa requerida por essas plantas, obtendo uma concentração final de 0,7 mg/L de sódio, 10,18 mg/L de magnésio, 176 mg/L de potássio, entre outros.

A concentração de sódio das vinhaças do presente estudo ficou muito elevada, necessitando de altas diluições o que acabaria eliminando os outros sais benéficos a plantas como rúcula e alface hidropônicos.

Portanto, no caso das vinhaças aqui apresentadas não seria possível sua aplicação em cultivos hidropônicos de tais plantas, porém essas vinhaças poderiam ser aplicadas para cultivos de algas marinhas as quais são adaptadas e necessitam de altas concentrações de sais.

#### 4. Conclusão

O presente capítulo mostrou que a simples gelatinização do amido não é favorável ao objetivo do estudo pois a conversão a açúcares não foi eficiente como na hidrólise ácida já realizada e a cepa utilizada no processo não tem capacidade de utilizar o amido mesmo que gelatinizado.

Não houve diferença significativa na eficiência de produção de etanol entre as diferentes concentrações de fontes de nitrogênio utilizadas, constituindo um ótimo resultado pela não necessidade de adicionar insumos no processo, indicando que o hidrolisado a partir da batata-doce da variedade Cuia possui nutrientes que satisfazem a exigência de nitrogênio da cepa.

As eficiências das fermentações alcoólicas de 5L com hidrolisado filtrado e não filtrado (Fermentação Líquida e Fermentação Semi-sólida) alcançaram valores de 99%, possivelmente em função das baixas concentrações de açúcar total inicial aplicadas. Concluiu-se que a fermentação do hidrolisado com os sólidos da batata-doce é tão eficiente quanto a fermentação com o caldo filtrado, indicando a possibilidade de redução de custos no processo pela eliminação de uma etapa (filtração ou centrifugação do caldo).

Os estudos mostraram bons resultados, porque eles favorecem a redução de custos no processo de produção de etanol a partir da batata-doce da variedade Cuia, sem a necessidade de adicionais fontes de nitrogênio e eliminando o processo de filtração do caldo.

Faz-se necessário o aumento da eficiência de fermentação quando utilizadas concentrações iniciais de açúcar total mais elevadas (~90g/L), buscando outras cepas que se adaptem a essas concentrações de açúcar mais altas.

O estudo revelou a presença de compostos aromáticos no produto destilado da fermentação, indicando a possibilidade de dar continuidade a estudos referentes à produção de uma aguardente a partir da batata-doce variedade Cuia.

De acordo com a caracterização das vinhaças, as mesmas não são boas alternativas para aplicação em cultivos hidropônicos de hortaliças porém parecem adequadas à aplicação em cultivos de algas marinhas, deixando de ser um resíduo do processo de produção de etanol tornando-se um subproduto

de valor agregado. Estudos de utilização desta vinhaça ficam como sugestão para trabalhos futuros.

Conforme o balanço de massa do processo de produção de etanol da batata-doce variedade Cuia da fermentação com 5 litros de caldo não filtrado (Fermentação Semi-Sólida), a partir de 750 g da matéria-prima pode-se produzir 153,5 g de etanol.

## REFERÊNCIAS

CAMPELO M.; CARDIAS H.; COSTA M. Avaliação do processo de hidrólise ácida da fécula de mandioca e mesocarpo de babaçu. **3º congresso Norte nordeste de química**. São Luís, Maranhão, 2009.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**, Rio de Janeiro, 183 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FERREIRA, F. **Produção de  $\beta$ -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Rio de Janeiro, 155 p. Tese (doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. Belo Horizonte, 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.

PACHECO T. F. **Fermentação com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia, 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

PINOTTI, R.F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB**, Piracicaba, v. 10, n.1, p.34-35, 1991.

RIZZOLO, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Estudos de diferentes condições de hidrólises ácidas da batata-doce para produção de etanol. **7º Congresso de Bioenergia**, São Paulo-SP, 2012.

SACHS, R. M. Crop feedstocks for fuel alcohol production. **California Agriculture**. p. 11-14, 1980.

SANTOS, *et al.* Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **Journal of Environmental Management**. 114, p. 8-12, 2013.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 434-440, 2009.

SOUZA, A. F. B. C. Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol. 2005

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 10, p. 1165-1168, 1996.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J.; GARVALHO, G. G. P. Potencialidade da integração lavoura-pecuária: relação planta-animal. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. VII, n. 01, p. 1695-7504, 2006.

ZISKA, L. H., RUNION, G. B., TOMECEK, M., PRIOR, S. A., TORBET, H. A., SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland, **Biomass and Bioenergy**, 33, p. 1503-1508, 2009.

## CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM TRÊS CEPAS DE LEVEDURA QUANTO À PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL E AGUARDENTE A PARTIR DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA

### Resumo

A batata-doce é um tubérculo produzido no mundo inteiro, de baixo custo e impacto ambiental, com sua distribuição voltada para consumo humano, porém com grande importância na alimentação animal, na produção industrial de farinha, amido e etanol, podendo representar uma boa alternativa para a agricultura familiar, com a implantação de usinas de etanol combustível ou de aguardente. O mercado de cachaça e aguardente tem muito o que crescer mundialmente e a produção nacional dessas bebidas terá que atender essa demanda com qualidade em seus produtos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* quanto à produção de etanol combustível e aguardente, a partir da batata-doce variedade Cuiá assim como avaliar a performance das fermentações com aumento da concentração de inóculo de  $10^7$  cel/mL para  $10^8$  cel/mL. A batata-doce foi hidrolisada em meio ácido, logo após o pH foi ajustado e o hidrolisado açucarado foi fermentado por 24 horas a 30°C. Foram utilizadas três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (LPB1-93, CA-11, ATCC 26602). Após a fermentação o caldo fermentado foi centrifugado a fim de remover os sólidos suspensos (biomassa e resíduos do substrato) analisar o consumo de açúcares totais, a produção do etanol e os Compostos Orgânicos Voláteis (COV). O aumento da concentração de inóculo mostrou ser relevante, reduzindo o tempo de fermentação. As eficiências das fermentações com as três cepas de leveduras estudadas alcançaram valores maiores que 90% na maioria dos tempos analisados. A partir das análises dos COV dos caldos fermentados pelas três cepas foi confirmada a possível obtenção de um produto de qualidade de acordo com os compostos voláteis presentes e com uma alta produtividade em L/ha, destacando-se a cepa LPB1-93 pela maior presença de compostos voláteis tais como acetato de etila (frutal, doce), 3-metil-1-butanol (frutado de banana, alcoólico), ácido caprílico (ceroso, seboso, desejável em algumas cervejas) e decanoato de etila (frutado de maçã e de uva). De acordo com balanço de massa realizado, a cepa LPB1-93 destacou-se com a maior produção de etanol de 25,74 g por 100g de batata-doce seca.

## 1. Introdução

A batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.), é cultivada em 111 países, sendo que aproximadamente 90% da produção é obtida na Ásia, apenas 5% na África e 5% no restante do mundo. Apenas 2% da produção está em países industrializados como os Estados Unidos e Japão. A China é o país que mais produz, com 100 milhões de toneladas (Silva *et al.*, 2002).

No Brasil, dos estados com maior participação, destacam-se o Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. A produtividade média brasileira é de 10 toneladas/hectare (Ferreira, 2008).

A cultura da batata-doce tem sido cultivada de forma artesanal pelas famílias rurais, visando à alimentação da família. Com o crescente êxodo rural, a produção brasileira teve um forte declínio nas últimas décadas. Por outro lado percebe-se que o índice de produtividade tem sido crescente nos últimos anos, revelando que o sistema de produção tem sofrido mudanças que indicam uma evolução no nível tecnológico, embora muitas tecnologias disponíveis ainda sejam raramente aplicadas nessa cultura. A cultura adapta-se melhor em áreas tropicais onde vive maior porção de populações pobres. Nessas regiões, além de constituir alimento humano de bom conteúdo nutricional, a batata-doce tem grande importância na produção industrial de farinha, amido e álcool (Silva *et al.*, 2002).

Assim como a mandioca, o sorgo e a cana-de-açúcar, a batata-doce possui as qualidades necessárias para ser utilizada como matéria-prima na produção de etanol. Não sendo muito exigente quanto à qualidade do solo, pode ser cultivada em terras semiáridas, sem prejudicar as plantações desta raiz voltadas à alimentação humana (Araújo *et al.*, 1978).

Outra vantagem competitiva da batata-doce é o seu curto ciclo de produção (5-6 meses), permitindo que sejam conduzidas duas safras por ano. Talvez um dos pontos fortes dessa cultura seja a sua vocação natural voltada para pequenas e médias propriedades. Em função de sua rusticidade e das exigências de terras de baixa a média fertilidade (preços menores) e do ciclo curto, essa é uma planta que se enquadra perfeitamente no sistema de agricultura familiar (Silveira, 2008).

Foi reportado em estudo da batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol de 1997 até 2007 que dentre os 102 clones coletados na região Norte, dez cultivares se mostraram promissoras para a produção de etanol, com elevado teor de amido, produtividade, resistência aos nematoides das galhas e insetos de solo. Com ciclo de produção variando de 4 a 6 meses, essas cultivares podem representar uma boa alternativa para a agricultura familiar, com a possibilidade de implantação de miniusinas de álcool combustível com capacidade de produção de 6.400 litros até 10.500 litros de etanol por hectare (Silveira, 2008).

Os dados mostrados relatam a eficiência da batata-doce como matéria-prima para produção de etanol combustível. Da mesma forma que a eficiência de bioetanol é alta, a produção de aguardente a partir da batata-doce também apresenta potencial pois esses dados podem ser correlacionados com os mesmos da cultura e produtividade, dados em litros de etanol por hectare de área cultivada.

A produção de cachaça alcançou 1,3 bilhão de litros por ano, número estável durante os últimos anos. Dados não oficiais estimam que a produção real seja próxima de 3,0 bilhões de litros por ano, constituindo a terceira bebida alcoólica mais consumida no mundo. Na área de bebidas, destacam-se a cachaça e a aguardente com uma produção anual aproximada de 1,5 bilhão de litro, sendo a cachaça a terceira bebida mais consumida no planeta, firmando-se como um importante produto do agronegócio brasileiro (Verdi, 2006). Dessa quantia anual, 70% é de cachaça industrial e 30% de cachaça artesanal. Esse consumo é provavelmente bem maior em função da informalidade e do consumo não declarado.

Segunda bebida mais consumida no Brasil, a cachaça vem conquistando mercados em razão dos esforços do setor produtivo aliados a ações governamentais em diversos níveis. Entretanto, a carência de ações eficazes no sentido de desenvolver a cadeia produtiva e de promover a qualidade e a sustentabilidade do produto, assim como a grande quantidade de marcas e variedades de características que trazem, não somente ao consumidor brasileiro, mas também aos importadores, certa dificuldade de diferenciação do produto no que se refere aos padrões de conformidade (Soratto *et al.*, 2007).

O envelhecimento, uma das etapas finais da elaboração da cachaça, é um processo no qual se desenvolvem naturalmente em recipientes apropriados, durante adequado período de tempo, certas reações físico-químicas que conferem ao produto alcoólico e à bebida alcoólica características sensoriais próprias do processo que não possuíam anteriormente, aprimorando a qualidade sensorial das bebidas nobres. (DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009; Soratto, 2007). Durante o envelhecimento são gerados os congêneres que agregam valores sensoriais e, conseqüentemente, financeiros aos destilados. (Aquino *et al.*, 2006).

Desta forma, fica claro que a produção de uma aguardente a partir do hidrolisado da batata-doce pode possuir alto valor comercial e uma grande atratividade para o mercado consumidor, tanto para comércio nacional quanto para exportação.

O mecanismo de envelhecimento é basicamente comum a todas as bebidas destiladas, porém, na indústria brasileira, a maioria das marcas de aguardentes não é envelhecida, mas adicionada de até 3% de sacarose, conforme permite a legislação (Barboza *et al.*, 2010).

Os processos de produção de cachaça utilizam várias etapas, incluindo a etapa de envelhecimento da bebida, etapa essa que pode levar de um ano a até dezenas de anos de acordo com o objetivo do produtor.

O processo de envelhecimento da cachaça é responsável pela produção dos compostos aromáticos que trazem efeitos benéficos na melhoria da qualidade sensorial do produto.

Entre esses Compostos Orgânicos Voláteis responsáveis pela valorização da aguardente, pode-se citar os seguintes: acetato de etila (frutal), 2-pentanona (frutado doce, vinho de banana), 3-metil-1-butanol (frutado de banana), acetato de isobutila (doce de banana), 2-hexanol (avinhado herbáceo), hexanoato de etila (frutado de abacaxi e banana verde), octanoato de etila (vinho frutado de damasco, de banana, de pera), decanoato de etila (frutado de maçã e uva).

A cachaça industrial é vendida a um preço em torno R\$0,70 o litro na destilaria e é comercializada em larga escala, tanto no mercado interno quanto no externo. A cachaça artesanal consegue um valor de, no mínimo, R\$1,30 por litro e, dependendo da forma como é comercializada, pode chegar, em média,

a R\$4,50 a R\$6,00 por litro. Em lojas especializadas, a cachaça artesanal é vendida a preços muito altos, dependendo da marca, podendo ultrapassar o valor de R\$200,00 por uma garrafa de 700 mililitros. Ou seja, o valor agregado na produção artesanal é muito elevado, já que o consumidor adquire um produto praticamente exclusivo. Para exportação, o preço varia entre US\$1,00 e US\$2,50 o litro, que é vendido no mercado internacional por US\$ 20,00 a US\$24,00 (Sakai, 2011).

A produtividade do etanol vai sempre depender da eficiência da fermentação, da concentração de açúcares fermentescíveis no caldo e da produtividade (t/ha) da matéria-prima. No Brasil já foi desenvolvida uma grande quantidade de variedades de batata-doce com altas produtividades (t/ha), com valores de produtividade de etanol próximos aos da cana-de-açúcar podendo ser até maiores em alguns casos.

## **2. Material e Métodos**

O processo produção de etanol combustível e aguardente, a partir da variedade de batata-doce variedade Cuia, iniciou com o corte, secagem e moagem da matéria-prima, preparo do caldo com os sólidos e fermentação, como já descrito nos capítulos anteriores.

### **2.1 Micro-organismos estudados nas fermentações alcoólicas**

Foram utilizadas três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602: a cepa LPB1-93 anteriormente selecionada, cepa CA-11, adquirida na empresa LNF Latino Americana e a cepa ATCC 26602, cedida pela Coleção de Cultura ARS, Unidade de Pesquisa de Bactérias Patogênicas e Micologia, Centro Nacional de Pesquisa de Utilização Agrícola-EUA.

A cepa CA-11, adquirida na empresa LNF Latino Americana é ideal para produções pequenas, médias e grandes. O início é imediato, com aproveitamento quase total da sacarose presente no caldo de cana-de-açúcar (hidrólise completa da sacarose com produção de glicose e frutose), baixa produção de ácidos e aldeídos, com sabor frutal e aroma diferenciado.

A cepa ATCC 26602, cedida pela Coleção de Cultura ARS, Unidade de Pesquisa de Bactérias Patogênicas e Micologia, Centro Nacional de Pesquisa de Utilização Agrícola-EUA, isolada de refinaria de açúcar, apresenta alta produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar, e possui tolerância a açúcar e fermentação bastante lenta.

### **2.2 Preparo do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia e fermentação alcoólica**

A partir do material sólido, seco e moído foi feito o caldo hidrolisado e a fermentação de acordo com metodologias já descritas nos Capítulos I e II.

Em seguida foi feita a inoculação com as três cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602) a fim de compará-las quanto à produtividade de etanol e produção de Compostos Orgânicos Voláteis. As coletas e análises das

amostras retiradas durante a fermentação foram realizadas de acordo com metodologias já descritas nos Capítulos I e II.

### **2.3 Avaliação da influência da concentração de inóculo das cepas testadas na eficiência da fermentação alcoólica**

A fim de aumentar a eficiência do processo e diminuir o tempo de fermentação alcoólica, foram realizados ensaios com as três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em questão (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602), nas mesmas condições anteriormente descritas, porém com a concentração de inóculo maior para  $10^8$  células por mL de hidrolisado, além da concentração até o momento utilizada de  $10^7$  cel/mL.

### **2.4 Cálculo da Eficiência da Fermentação e da Produtividade do Etanol**

Os cálculos de eficiência da fermentação e produtividade do etanol foram realizados de acordo com Equação 1 e 2, mostrados do Capítulo II, itens 2.4 e 2.5, respectivamente.

### **2.5 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV) produzidos no processo de fermentação alcoólica**

Os Compostos Orgânicos Voláteis foram analisados segundo metodologia descrita no item 2.7 do Capítulo III.

Após o término do processo de fermentação (24 horas) com as três cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC-26602), amostras dessas fermentações foram analisadas em Cromatógrafo Gasoso a fim de avaliar a presença de Compostos Orgânicos Voláteis e verificar o potencial de cada cepa como produtoras de uma aguardente com qualidade em compostos aromáticos.

## **2.6 Balanço de massa da produção de etanol combustível produzido na fermentação alcoólica a partir do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia**

Para realizar o balanço de massa, primeiramente definiu-se o processo, as fronteiras nas quais o balanço seria efetuado.

Considerou-se a massa de batata-doce seca que entra no processo como 100g, os açúcares presentes antes e depois do pré-tratamento com HCl 1,5% v/v e o etanol produzido a partir de 100 g secos da batata-doce variedade Cuia.

### 3. Resultados e Discussão

A fim de verificar o consumo dos açúcares e a produção de etanol, amostras das fermentações foram coletadas a cada 6 horas até completar 24 horas e analisadas em HPLC.

#### 3.1 Fermentação alcoólica com as três cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602) e aumento da concentração de inóculo

Foram adquiridas duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a fim de comparar suas performances com a cepa anteriormente selecionada (LPB1-93) já que esta apresentou características adequadas tanto para produção de etanol combustível como para produção de aguardente devido à presença de compostos aromáticos. As duas cepas escolhidas apresentavam características adequadas à produção de cachaça (CA-11) e à produção de etanol combustível (ATCC 26602). Historicamente, os micro-organismos mais comumente utilizados na fermentação alcoólica têm sido as leveduras do gênero *Saccharomyces* e, dentre essas, *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie.

A fim comparar as performances das três cepas estudadas no processo de fermentação alcoólica, assim como comparar a concentração de inóculo comumente utilizada ( $10^7$  cel/mL) com uma concentração de inóculo mil vezes maior ( $10^8$  cel/mL), foram desenvolvidos experimentos com tais características como mostra a FIGURA 5, nos gráficos A-B (cepa LPB1-93); C-D (cepa CA-11); E-F (ATCC 26602).

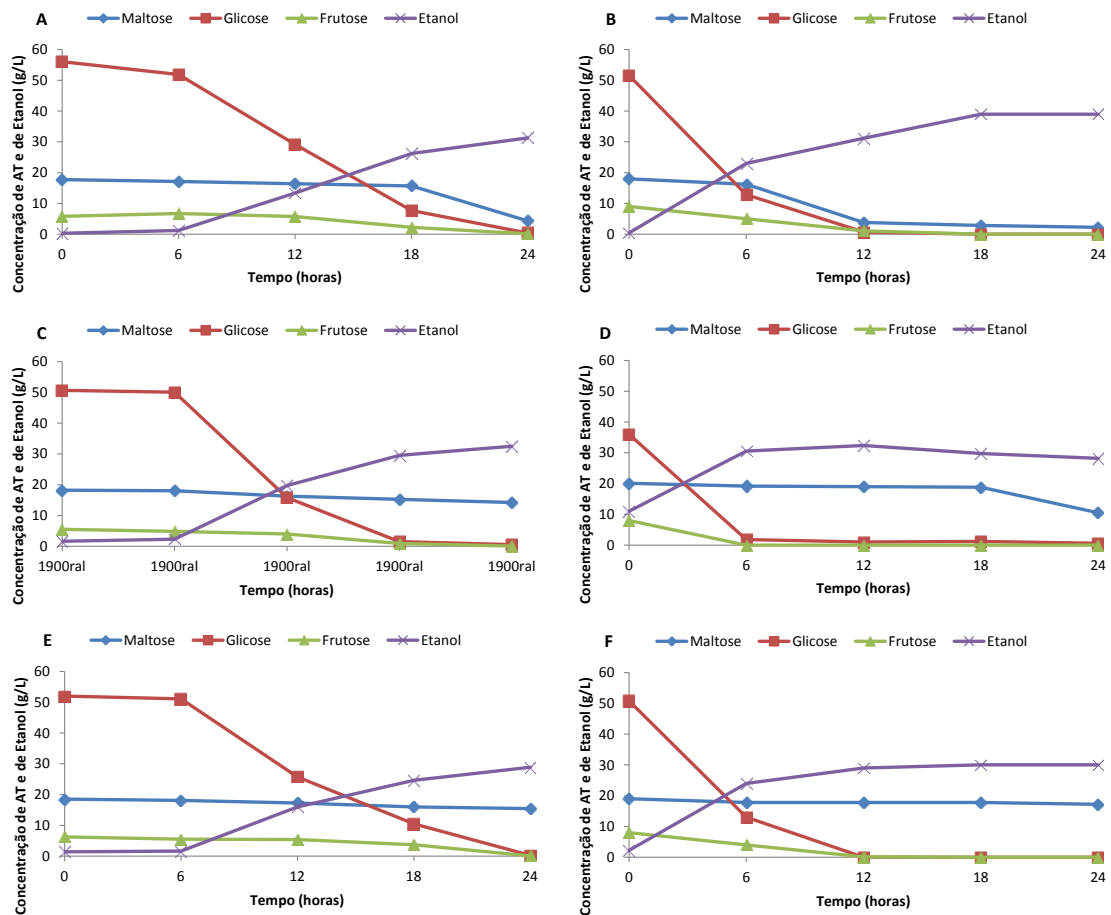


FIGURA 5 - COMPARAÇÃO DAS PERFORMANCES DAS TRÊS CEPAS ESTUDADAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA, A PARTIR DE HIDROLISADO DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA, LPB1-93 (GRÁFICOS A; B), CA-11 (GRÁFICOS C; D) E ATCC 26602 (GRÁFICOS E; F) QUANTO ÀS DUAS CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO APLICADAS,  $10^7$  cel/mL (GRÁFICOS A; C; E) E  $10^8$  cel/mL (GRÁFICOS B; D; F)

Nota-se que, no tempo de 6 horas de fermentação, aplicando a concentração de inóculo de  $10^8$  cel/mL (gráficos B; D; F), a glicose, açúcar em maior concentração, foi quase totalmente consumida, seguida pela frutose e maltose. Essa última foi consumida quase totalmente somente pela cepa LPB1-93 e um pouco consumida (8,3 g/L de 18,8 g/L iniciais) após 18 horas pela cepa CA-11 com a concentração de inóculo maior. A cepa ATCC 26602 não consumiu maltose em nenhum dos casos, dando preferência para glicose e frutose.

É interessante que o açúcar residual seja minimizado, afinal não se deseja que ao término do processo ainda haja matéria-prima a ser consumida, pois tal fato resultaria em prejuízo para a indústria, e esse açúcar seria agregado ao efluente do processo, necessitando de tratamento ou provocando problemas ambientais (Pacheco, 2010). Entretanto, estender o processo

fermentativo até a exaustão dos açúcares só tem sentido se houver aumento expressivo na produção do produto.

Nos ensaios com a concentração de inóculo comumente usada nos outros testes,  $10^7$  cel/mL (gráficos A; C; E), o consumo de açúcar foi mais lento, mostrando que a glicose só foi esgotada entre 18 e 24 horas de fermentação, assim como os outros açúcares, quando consumidos.

Camili (2012), estudando a produção de etanol a partir da polpa de mandioca, descreve que os tratamentos que obtiveram maiores teores de etanol encontravam-se na faixa de tempo entre 12 e 18 horas, com uma concentração de levedura de 8% m/m, com a produção de etanol sendo influenciada pela interação do tempo de fermentação e concentração de levedura.

Pacheco (2010), estudando a fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes, relata que a concentração celular no inóculo foi a variável que mais afetou as respostas analisadas, ou seja, o aumento na concentração celular no inóculo provocaram um aumento na eficiência e na produtividade de etanol, diminuindo os níveis residuais de sacarose.

Percebe-se então que o aumento da concentração de inóculo acelerou o processo de consumo de açúcares e de produção de etanol, resultando em maiores concentrações de etanol em tempos menores.

As figuras a seguir mostram as eficiências das fermentações (%), ou seja, a produção do etanol em função do açúcar consumido, de seis em seis horas.

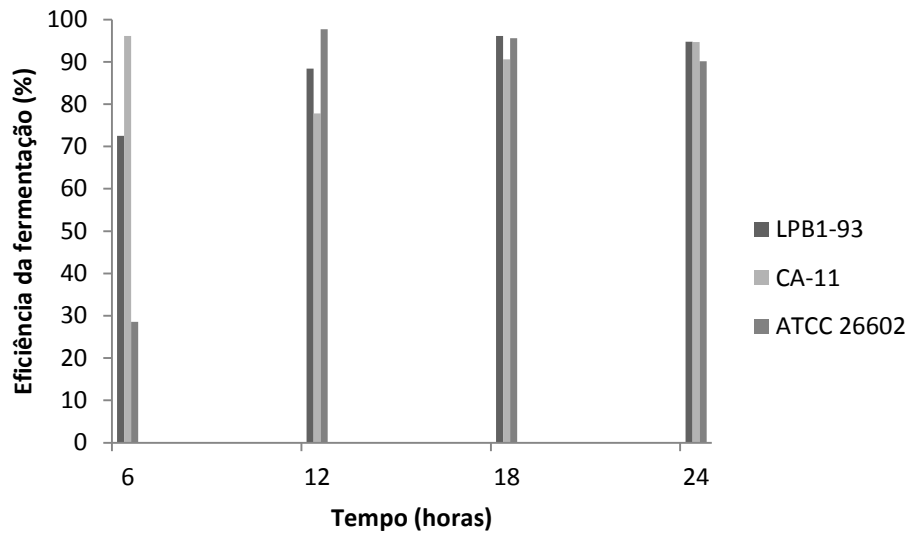


FIGURA 6 - EFICIÊNCIA DAS FERMENTAÇÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO E DAS CEPAS ESTUDADAS (LPB1-93, CA-11 E ATCC 26602) COM A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^7$  cel/mL DE MEIO

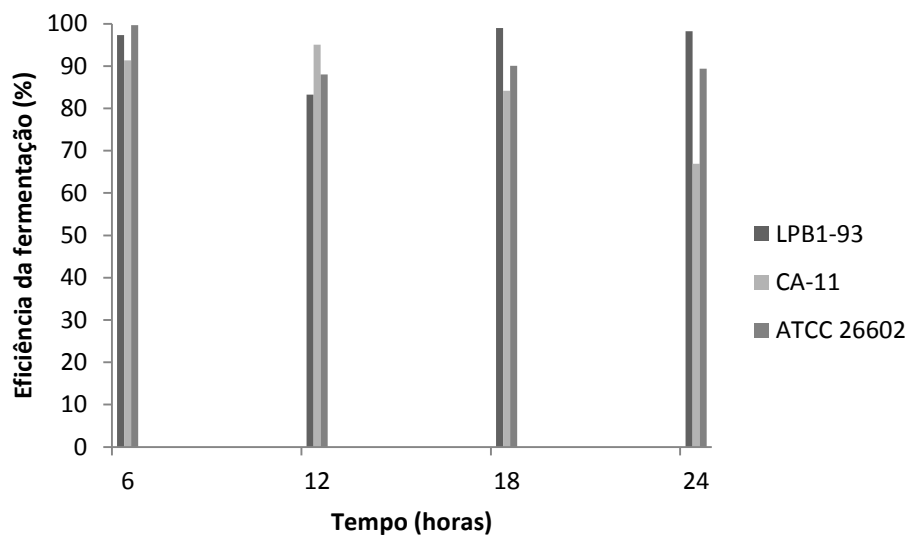


FIGURA 7 - EFICIÊNCIA DAS FERMENTAÇÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO E DAS CEPAS ESTUDADAS (LPB1-93, CA-11 E ATCC 26602) COM A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^8$  cel/mL DE MEIO

A partir dos gráficos em barras, que comparam as médias das eficiências das fermentações que consideram o etanol produzido em função do açúcar consumido, nota-se que a eficiência foi influenciada diretamente com o aumento da concentração de inóculo no primeiro tempo analisado (6 horas).

Foi realizada uma análise ANOVA a partir das médias das EF das três cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602) nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas, com a concentração de inóculo de  $10^8$  cel/mL. Os dados não mostram

diferença significativa, já que o valor de F calculado sempre foi maior que o F crítico determinado para um intervalo de confiança de 95%.

As tabelas a seguir (TABELA 16, 17 e 18) mostram os principais parâmetros analisados quanto à produção anual de etanol (duas safras), pelas cepas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602), com as duas concentrações de inóculo estudadas ( $10^7$  e  $10^8$  cel/mL), como forma de comparação.

TABELA 16 - COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^7$  cel/mL E  $10^8$  cel/mL QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA LPB1-93, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS

Parâmetros	$10^7$				$10^8$			
	6h	12h	18h	24h	6h	12h	18h	24h
Ai (g/L)	79,75	79,65	79,65	79,65	78,6	78,6	78,6	78,6
Ac (g/L)	4	28,35	54,05	74,9	44,6	73	75,5	76,1
Ep (g/L)	1,2±0,35	13,05±0,71	25,9±0,28	31±1,27	22,6±0,71	30,82±0,49	38,62±1,41	38,62±1,41
EF (%)	63,3	88,4	96,1	94,7	99,4	83,2	98,9	98,25
P (L/ha/a)	5094	10161	10578	9136	11196	9320	11292	11202

\*Ai=Açúcar inicial; \*Ac=Açúcar consumido; \*Ep=Etanol produzido; \*EF=Eficiência da Fermentação; \*P=Produtividade

TABELA 17 - COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^7$  cel/mL E  $10^8$  cel/mL QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA CA-11, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS

Parâmetros	$10^7$				$10^8$			
	6h	12h	18h	24h	6h	12h	18h	24h
Ai (g/L)	74,4	74,4	74,4	74,4	64,1	64,1	64,1	64,1
Ac (g/L)	1,45	38,4	56,75	59,65	43,1	44,1	44,1	53
Ep (g/L)	2,3±0,14	18,15±0,28	27,95±0,07	30,9±0,78	19,6±0,42	21,4±0,28	18,8±0,07	17,2±0,78
EF (%)	92,6	77,8	90,6	94,6	89,2	95	84,1	66,8
P (L/ha/a)	10657	10434	10872	11435	10038	10712	9410	7164

\*Ai=Açúcar inicial; \*Ac=Açúcar consumido; \*Ep=Etanol produzido; \*EF=Eficiência da Fermentação; \*P=Produtividade

TABELA 18 - COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO DE  $10^7$  cel/mL E  $10^8$  cel/mL QUANTO AOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ANALISADOS (AC, EP, EF E P), DA CEPA ATCC 26602, EM 6, 12, 18 E 24 HORAS

Parâmetros	$10^7$				$10^8$			
	6h	12h	18h	24h	6h	12h	18h	24h
Ai (g/L)	76,75	76,75	76,75	76,75	77,8	77,8	77,8	77,8
Ac (g/L)	2,05	24,35	46,65	61,05	43	59,9	60	60,6
Ep (g/L)	1,6±0	14,6±1,06	23±0,71	27,5±0,78	22±0,07	26,8±0,35	27,8±0,14	27,8±0,14
EF (%)	23,1	97,6	95,5	90,1	99,4	88	90	89,3
P (L/ha/a)	2154	11368	11002	9944	11191	9877	10228	10127

\*Ai=Açúcar inicial; \*Ac=Açúcar consumido; \*Ep=Etanol produzido; \*EF=Eficiência da Fermentação; \*P=Produtividade

Andrietta (2006) expõe que o caldo da cana, que apresenta uma produtividade de etanol perto de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar, é a única matéria prima utilizada em escala industrial para a produção do etanol combustível no Brasil.

Silva (2010), estudando a comparação entre metodologias visando obtenção de maior produtividade de etanol a partir da batata-doce, obteve um

valor de produção em campo estimado de 9.448,34 L/ha com a variedade Amanda, a qual apresentava uma produtividade no campo de 46,7 t/ha.

Os ensaios experimentais do estudo citado acima (Silva, 2010), incluindo o plantio, o processamento de obtenção de etanol a partir da batata-doce, o procedimentos de laboratório e o tratamento dos resultados, foram realizados na área experimental da Universidade Federal do Tocantins – UFT, especificadamente no Laboratório de Sistema de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis (LASPER), onde se encontra uma mini-usina de processamento de etanol a partir da batata-doce. Essa usina tem uma produção de 170 L etanol/dia, com a hidrólise realizada por meio enzimático, por 36 horas de fermentação. Porém, em maio de 2014, essa mesma Universidade inaugurou uma mini-usina que promete uma produção de 3 mil litros de etanol/dia (SUDAM Assessoria, 2014).

Rodrigues *et al.* (2009) realizaram um levantamento dos custos para implantação do cultivo da batata-doce em reassentamentos e os resultados apresentaram uma produtividade agrícola em média de 24 t/ha, sendo que o custo médio por tonelada colhida foi de R\$ 90,00. Quanto à produção de etanol, a produtividade média obtida foi de 171 litros/toneladas e de 4.104 litros de etanol por hectare. Diante dos resultados para atender a requerida capacidade de funcionamento da miniusina de 500 litros/dia, será necessário um sistema de plantio em uma área de aproximadamente 4 ha/mês.

Jin *et al.* (2012) estudaram o desempenho na produção de etanol de dez variedades de batata-doce, assim como o consumo das matérias-primas e a ocupação do solo para a produção de 1 tonelada de etanol anidro. Os resultados indicaram que as duas melhores variedades de batata-doce, denominadas NS 007 e SS 19, apresentaram o menor consumo de matéria-prima (6,19 e 7,59 toneladas de batata-doce por tonelada de etanol, respectivamente) e a menor ocupação do solo (0,24 e 0,24 hectares por tonelada de etanol, respectivamente).

A produtividade média da batata-doce fresca é 13 – 33 toneladas/ha, e o teor de amido de batata-doce fresca é de cerca de 18 – 30%. Com a tecnologia atual, cerca de 8 toneladas de batata-doce fresca pode produzir 1 tonelada de etanol (Qiu *et al.*, 2010).

O presente estudo indica que são necessárias 7,46 toneladas de batata-doce variedade Cuia para se produzir 1 tonelada de etanol e 0,15 hectares plantados dessa variedade para que se produza 1 tonelada de etanol. Tais valores representam uma condição na qual consideram-se os máximos rendimentos, tanto o rendimento do pré-tratamento, assim como o máximo rendimento da fermentação, ou seja, uma situação em que o amido presente na batata-doce variedade Cuia foi totalmente convertido em açúcares fermentescíveis (13,14 t/ha) e 51 % desses açúcares fermentescíveis foram convertidos a etanol durante o processo de fermentação.

A matéria-prima é responsável por metade do custo de produção do etanol. Casos em que menos matéria-prima é consumida acarreta na redução do custo de produção do etanol. Uma menor ocupação de terras resulta em custo reduzido de cultivo. Todos estes fatores contribuem para um menor custo de matéria-prima para produção de etanol (Jin, *et al.*, 2012).

Magalhães *et al.* (2012) analisaram a sustentabilidade da cadeia produtiva de etanol a partir da batata-doce no município de Palmas – TO, comparado com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, nas óticas privada e social. Tal análise demonstrou que na produção primária o cultivo da batata-doce apresenta maior vantagem do que o da cana devido ao ciclo de produção da batata-doce ser de 5-6 meses enquanto que o da cana é de 12 meses. Porém, ressalta-se que os ganhos finais com a cana-de-açúcar devem-se fundamentalmente à larga escala em que a mesma é cultivada. Os autores ressaltam também que, no caso da batata-doce, seria aconselhável a organização em associações de pequenos produtores para montagem de miniusinas, plantio e cultivo criando sustentabilidade na cadeia produtiva, que poderia baixar os custos de produção, o que pode ser vantagem aos pequenos produtores.

### **3.2 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis dos fermentados pelas três cepas estudadas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26602)**

Foram analisados os compostos voláteis em cromatógrafo gasoso a fim de avaliar o potencial para a produção de uma aguardente com qualidade em compostos aromáticos, conforme TABELA 19 mostra para cada cepa estudada.

TABELA 19 - COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NAS FERMENTAÇÕES DE CADA CEPAS ESTUDADA, A PARTIR DE CALDO HIDROLISADO DA BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA

COV	Cepas		
	LPB1-93	CA-11	ATCC 26602
	Ácido caprílico, acetato de etila, 3-metil-1-butanol, decanoato de etila	Ácido caprílico, decanoato de etila, 1-decanol	Ácido caprílico, decanoato de etila e 1-decanol

Os compostos voláteis encontrados têm as seguintes características aromáticas, respectivamente: acetato de etila (frutal, doce), 3-metil-1-butanol (frutado de banana, alcoólico), ácido caprílico (ceroso, seboso, desejável em algumas cervejas), decanoato de etila (frutado de maçã e de uva) e 1-decanol (frutado de uva).

Alguns compostos presentes nas aguardentes produzidas no atual estudo (acetato de etila, 3-metil-1butanol, decanoato de etila e 1-decanol) foram encontrados também em cachaças e aguardentes em outros estudos (Alvarenga, *et al.*, 2013; Cortéz *et al.*, 2011; Facundo *et al.*, 2012), aromas esses comumente encontrados em tais bebidas, trazendo qualidade sensorial ao produto.

Muitas transformações químicas e produção de compostos estão relacionadas ao processo de maturação e envelhecimento de destilados tais como aldeídos, ácidos e ésteres. A oxidação e a esterificação dos alcoóis originam aldeídos e ésteres, assim como a oxidação dos produtos de degradação da lignina por etanolise, melhoram o aroma e tornam o sabor da cachaça mais agradável (Cardello; Faria, 1999; Reazi, 1981).

Foi verificada a presença dos compostos voláteis nas três aguardentes do presente estudo, que dão características sensoriais positivas para uma aguardente, indicando a possibilidade de eliminação ou redução de tempo da etapa de armazenamento em barris de madeira com o objetivo de obter aromáticos como acontece na produção de cachaça, resultando na diminuição de uma etapa, reduzindo custos do processo.

### 3.3 Balanço de massa da produção de etanol combustível produzido na fermentação alcoólica a partir do hidrolisado da batata-doce variedade Cuia

Para a elaboração do balanço de massa e análise do que ocorre nas diferentes etapas, fez-se um estudo das correntes de entrada e saída, medindo-se as quantidades de açúcares totais fermentescíveis em 100 g de batata-doce seca e as quantidades de etanol produzido por cada cepa estudada, considerando tempo de fermentação de 12 horas.

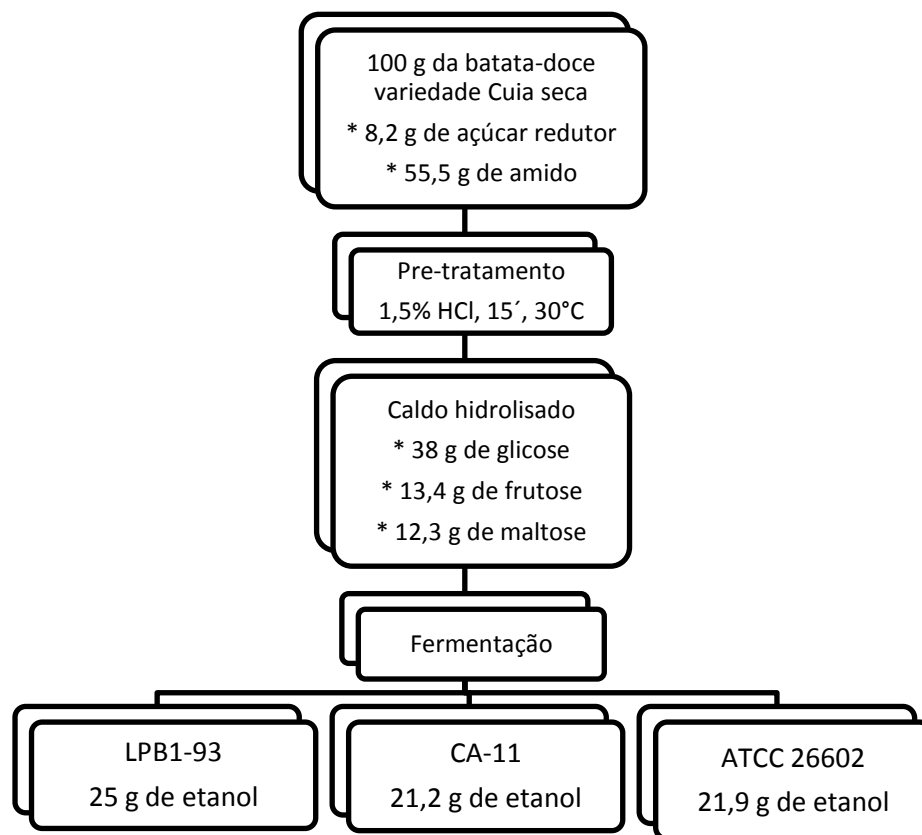


FIGURA 8 - BALANÇO DE MASSA DA CONVERSÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS PRESENTES EM 100 g EM BASE SECA DE BATATA-DOCE VARIEDADE CUIA A ETANOL, PELAS TRÊS CEPAS ESTUDAS, EM 12 HORAS DE FERMENTAÇÃO

Nota-se o aumento na concentração dos açúcares fermentescíveis após o pré-tratamento ácido, os quais antes estavam arranjados na forma de amido.

De acordo com o balanço de massa apresentado na FIGURA 8, percebe-se que a maior produção de etanol a partir de 100 g da batata-doce variedade Cuia seca foi pela fermentação da cepa LPB1-93, com 25 g de

etanol. Porém as outras duas cepas estudadas (CA-11 e ATCC 26602) apresentaram valores bastante próximos de etanol (21,2 g e 21,9 g respectivamente) por 100 g de batata-doce variedade Cuia seca. Esses resultados indicam o potencial das três cepas estudadas para a produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia. Assim, de acordo com o processo acima descrito, em 1Kg de batata-doce variedade Cuia seca são encontrados 555 g de amido e produzidos 250 L de etanol.

Comparando com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, onde se obtém em média 7000 L/ha/ano, a produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia foi de 9320 L/ha/ano considerando duas safras por ano, com um tempo de fermentação de 12 horas.

#### 4. Conclusão

O aumento da concentração celular no inóculo mostrou ser muito efetivo para diminuir o tempo de consumo dos açúcares e de produção do etanol, acarretando num processo menos custoso sendo possível reduzir o tempo de fermentação de 24 horas para 12 horas.

As três cepas estudadas (LPB1-93, CA-11 e ATCC 26620) no processo de fermentação alcoólica a partir de hidrolisado de batata-doce variedade Cuia, mostraram ser boas produtoras de etanol, apresentando na maioria dos casos eficiências de utilização do açúcar solúvel acima de 90% e produtividade de etanol de 9 mil a 11 mil litros de etanol por hectare, considerando duas safras por ano, tanto em 6, 12, 18 e 24 horas, com concentração celular inicial de  $10^8$  células/mL.

O balanço de massa indicou a cepa LPB1-93 como a mais apropriada para a produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia.

Na produção de aguardente a partir da batata-doce alguns compostos requeridos para uma bebida de qualidade sensorial já foram obtidos durante a fermentação, indicando a não necessidade de envelhecimento em barris de madeira, resultando na diminuição de uma etapa, reduzindo gastos do processo. Portanto, de acordo com resultados apresentados pelo presente estudo, pode vir a ser desenvolvido um produto (aguardente) de alta qualidade a partir de uma matéria-prima diferenciada em termos qualitativos, quantitativos e sustentáveis, visando o aumento da demanda de tal produto no mercado nacional e internacional, proporcionando uma nova fonte de renda para a agricultura familiar.

Conclui-se então que o processo de produção de etanol a partir da batata-doce variedade Cuia é viável, podendo o produto ser aplicado nas indústrias de combustível, bebida, química e farmacêutica, representando uma fonte alternativa de renda para a agricultura familiar.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, L. M.; ALVARENGA, R. M.; DUTRA, M. B. L.; OLIVEIRA, E. S. Avaliação da fermentação e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga. **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, v. 24, n. 2, p. 195-201, 2013.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**, Universidade de Campinas, 2006.
- AQUINO, F. W. B., NASCIMENTO, R. F., RODRIGUES, S., CASEMIRO, A. R. S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(1), p. 145-149, 2006.
- ARAÚJO N. Q.; *et al.* **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol.** [s.l.], 1978
- BARBOZA, R. A. B., MENEGHIN, M. C., SANTOS, V. R., FONSECA, S.A., FARIA, J.B. Efeito do envelhecimento na qualidade da cachaça produzida por pequenos produtores. **Revista Ciência em Extensão**, v. 6, n. 2, p. 48, 2010.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
- CAMILI, E. A.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir de polpa de mandioca. **Energia na Agricultura**. v. 27, n. 2, p. 01-19, 2012.
- CARDELLO, H. M. A.; FARIA, J. B. Análise tempo-intensidade de características sensoriais de cachaça de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus* sp). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 27-34, 1999.
- CORTÉS, S.; RODRÍGUEZ, R.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds. **Food Control**, 22, p. 673-680, 2011.
- FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; DIAS, C. T. S.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds

during ripening in cold storage. **Food Research International**, 49, p. 626–633, 2012.

FERREIRA, A. Batata-doce. Edição 713, **Revista A Granja**, 2008.

JIN, Y.; FANG, Y.; ZHANG, G.; ZHOU, L.; ZHAO, H. Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages. **Acta Oecologica**, p. 1-5, 2012.

MAGALHÃES, K. B.; RODRIGUES, W ; SILVEIRA, M. A. Análise custo-benefício social da cadeia produtiva de etanol de batata-doce no Estado de Tocantins. **Custos e @gronegocio on line**. v. 8, n. 1, 2012.

PACHECO T. F. **Fermentação com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia, 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

QIU, H.; HUANGA, J.; YANGA, J.; ROZELLE, S.; ZHANG, Y.,.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy, **Applied Energy**, 87, p. 76-83, 2010.

REAZIN, G H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n.4, p. 283-289, 1981.

RODRIGUES, L. U.; MAGALHÃES, K. A. B. Levantamento dos custos para implantação do cultivo da batata-doce em reassentamentos da Enerpeixe no município de São Salvador e ou Paranã - TO. **V Seminário de Iniciação Científica da UFT**, 2009.

SAKAI, R. H. **Cachaça**. [Brasília, 2011] Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 20 fev. 2014.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.2, cap.22, p 448-505. 2002.

SILVA, J. O. V. **Comparação entre metodologias visando obtenção de maior rendimento de etanol a partir da batata-doce [Ipomea batatas (L.) Lam.]**, em Palmas-TO. Palmas, 63 p. Dissertação (Mestre em Agroenergia). Universidade Federal de Tocantins, Tocantins, 2010.

SILVEIRA, M. A. Batata-Doce: uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

SORATTO, A. N., VARVAKIS, G., HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(4), p. 681-687, 2007.

SUDAM Assessoria. Tocantins vai inaugurar miniusina que produz etanol a partir da batata doce. [Tocantins, 2014]. Disponível em: <<http://www.novacana.com>>. Acesso em: 23/06/2014.

VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, SP, v.36, n.2, fev. 2006.

**Sugestões para futuros trabalhos:**

Analisar o resíduo sólido após fermentação para direcioná-lo a um uso ou tratamento de acordo com suas propriedades.

Verificar qualidade das aguardentes mediante análises físico-químicas com base na legislação brasileira que especifica valores para compostos voláteis totais (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores) e posterior comparação aos padrões de aguardentes de vegetais existentes na legislação brasileira.

Realizar análise sensorial das aguardentes produzidas a partir da batata-doce variedade Cuia com as três cepas estudadas.

Realizar estudos de aplicação da vinhaça para cultivo de algas marinhas devido ao alto teor de sais presente na mesma.

Testar mais um aumento de concentração de inóculo ( $10^9$  cel/mL) a fim avaliar a possibilidade de diminuir o tempo da finalização da fermentação alcoólica.

Aplicar ao processo de fermentação alcoólica a ferramenta de Avaliação do Ciclo de Vida, a fim de identificar pontos negativos a serem melhorados do processo de produção de etanol e de aguardente a partir da batata-doce variedade Cuia.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- AKPONAH E.; AKPOMIE O. O.; UBOGU, M. Bio-ethanol production from cassava effluent using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from rafia palm (*Elaeis guineesi*) SAP. **European Journal of Experimental Biology**, 3(4):247-253, 2013.
- ALVARENGA, L. M.; ALVARENGA, R. M.; DUTRA, M. B. L.; OLIVEIRA, E. S. Avaliação da fermentação e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga. **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, v. 24, n. 2, p. 195-201, 2013.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**, Universidade de Campinas, 2006.
- ARAÚJO, N. Q.; et al. **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol**. [s.l], 1978.
- AQUINO, F. W. B., NASCIMENTO, R. F., RODRIGUES, S., CASEMIRO, A. R. S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(1), p. 145-149, 2006.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J; MANZANARES P. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875I. **Process Biochemistry**, 39, p. 1843-1848, 2004.
- BARBOZA, R. A. B., MENEGHIN, M. C., SANTOS, V. R., FONSECA, S.A., FARIA, J.B. Efeito do envelhecimento na qualidade da cachaça produzida por pequenos produtores. **Revista Ciência em Extensão**, v. 6, n. 2, p. 48, 2010.
- BRADBURY, J.H. Chemical composition of tropical roots crops and its implication for nutrition. In: **Eighth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops**, Bangkok, cap 3, p. 51, 1990.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
- CAMILI, E. A.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir de polpa de mandioca. **Energia na Agricultura**. v. 27, n. 2, p. 01-19, 2012.
- CAMPELO M.; CARDIAS H.; COSTA M. Avaliação do processo de hidrólise ácida da fécula de mandioca e mesocarpo de babaçu. **3º congresso Norte nordeste de química**. São Luís, Maranhão, 2009.
- CARDELLO, H. M. A.; FARIA, J. B. Análise tempo-intensidade de características sensoriais de cachaça de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus* sp). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 27-34, 1999.
- CARDONA E.; RIOS J.; PEÑA J.; RIOS L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, 118, 41–47, 2014.

CASTRO, L.A.S.; EMYGDIO, B.M. Batata-doce com potencial para produção de biocombustível. **Acesso Genéticos**, EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS. p. 2, 2008.

CHIES, V. Sobre a semana de bioenergia. **Agroenergético**, Informativo da Embrapa Agroenergia, Edição nº 40, 2013.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**, Rio de Janeiro, 183 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

COLLINS, W. W. Progress in developing sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars for fuel alcohol production. In: **VI Symposium of the International Society for Tropical Roots and Crops**. Lima, p. 571-575, 1984.

CORTÉS, S.; RODRÍGUEZ, R.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds. **Food Control**, 22, p. 673-680, 2011.

FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; DIAS, C. T. S.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, 49, p. 626–633, 2012. FERREIRA, A. Batata-doce. Edição 713, Revista A Granja, 2008.

FERREIRA, F. Produção de  $\beta$ -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. Rio de Janeiro, 155 p. Tese (doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FREITAS, R.J.S.; DAHER, A.L.K.; SANTOS, M.A.B.; TIBONI, E.B.; CECATO, E. **Técnicas Analíticas de Alimentos**. Tecpar: Curitiba, p. 114, 1979.

HÄGERDAL, H.B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanol fermentation of Pentoses in Lignocellulose Hydrolysates. **Applied Microbiology**, 1991.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**. Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, 2010.

JIN, Y., FANG, Y., ZHANG, G., ZHOU, L., ZHAO, H. Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages. **Acta Oecologica**, p. 1-5, 2012.

JOSEPH, H. J., O Uso do Álcool Combustível nos Veículos Flex Fuel. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

JUNCHEN, L.; IRFAN, M.; LIN, F. Bioconversion of agricultural waste to ethanol: A potential source of energy. **Archives Des Sciences**. v.65, n.12, 2012.

- KIM, K; HAMDY, M.K. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.3, p. 31-320, 1985.
- KUMAR P.; BARRETT D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P.. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res**, 48, p. 3713–3729, 2009.
- LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.
- LICHTENTHALER, F. W. Carbohydrates as renewable Raw materials: a major Challenge of green Chemistry. **Methods and Reagents for Green Chemistry: An introduction**, 2007.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 1º edição, v.3, cap 1:1-43, 2001.
- LOPES, C. H. Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Alcool, 32p. 1987.
- LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, 98, p. 3367-3374, 2007.
- MAGALHÃES, K. B.; RODRIGUES, W.; SILVEIRA, M. A. Análise custo-benefício social da cadeia produtiva de etanol de batata-doce no Estado de Tocantins. **Custos e @gronegocio** on line. v. 8, n. 1, 2012.
- MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. Belo Horizonte, 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.
- MANCILHA, I.M.; PEARSON, A. M.; MOMOSE, H.; PESTKA, J.J. Technical Note Increasing Alcohol Yield by Selected Yeast Fermentation of Sweet Sorghum. II. Isolation and Evaluation of Mutants and Wild Types for Ethanol Production. **Food Chemistry**, 14, p. 313-318, 1984.
- MCMILLAN, J. D. **Xylose fermentation to ethanol: a review**. National Renewable Energy Laboratory, A Division of Midwest Research Institute Operated for the U.S. Department of Energy, 1993.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica**. Caxias do Sul, RS: Educs, 2005.
- NETO, A. C. G. Aptidões para consume humano, produção de etanol e alimentação animal em clones de batata-doce. Lavras, 78 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais, 2010.
- PACHECO T. F. **Fermentação com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia, 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Uberlândia, Minas Gerais, 2010.
- PINOTTI, R.F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB**, Piracicaba, v. 10, n.1, p.34-35, 1991.

QIU, H.; HUANGA, J.; YANGA, J.; ROZELLE, S.; ZHANG, Y.,; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy, **Applied Energy**, 87, p. 76-83, 2010.

REAZIN, G H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n.4, p. 283-289, 1981.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **2012 pocket guide to ethanol**. February, 2012.

RIBEIRO, N.; GODINHO, A.M.M.; MARQUES, T.A. Produção de glicose a partir do amido da batata-doce por hidrólise ácida. **Colloquium Agrariae**, Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Presidente Prudente, v. 5, n.especial, p. 244-247, 2009.

RIZZOLO, J. A., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Estudos de diferentes condições de hidrólises ácidas da batata-doce para produção de etanol. **7º Congresso de Bioenergia**, São Paulo-SP, 2012.

RODRIGUES, L. U.; MAGALHÃES, K. A. B. Levantamento dos custos para implantação do cultivo da batata-doce em reassentamentos da Enerpeixe no município de São Salvador e ou Paranã - TO. **V Seminário de Iniciação Científica da UFT**, 2009.

RODRIGUES, M. Q. R. B. **Expressão heteróloga de celulases em Kluyveromyces marxianus para utilização em bioprocessamento consolidado na produção de etanol celulósico**, Viçosa, 121 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Viçosa, Minas Gerais, 2012.

ROSSAFA, L. A. Álcool: Combustível para o Desenvolvimento Nacional e Construção da Paz Mundial, Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). *The Alcohol Textbook. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: UK: Nottingham University Press, 2003.

SACHS, R.M. Crops feedstock for fuel alcohol production. **California Agriculture**, v.34, n.6, p. 11-14, 1980.

SAKAI, R. H. **Cachaça**. [Brasília, 2011] Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 20 fev. 2014.

SANTOS, J. R. Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas. Lisboa, 63 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

SANTOS, et al. Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **Journal of Environmental Management**. 114, p. 8-12, 2013.

Sebrae - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Cachaça Artesanal** - Estudos mercadológicos, 84 p. 2013.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; Z Aidul, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at subgelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 434-440, 2009.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.2, cap.22, p 448-505. 2002.

SILVA, J. O. V. **Comparação entre metodologias visando obtenção de maior rendimento de etanol a partir da batata-doce [Ipomea batatas (L.) Lam.]**, em **Palmas-TO**. Palmas, 63 p. Dissertação (Mestre em Agroenergia). Universidade Federal de Tocantins, Tocantins, 2010.

SILVEIRA, M. A. et. al. Resistência de clones de batata-doce coletados no Estado do Tocantins a insetos de solo e nematóides causadores de galhas. **Horticultura Brasileira**. v. 20, n. 2, 2002.

SILVEIRA, M. A.; TAVARES, I. B.; ANDRÉ, C. M. G. et al. Seleção de acessos de batata-doce obtidos via programa de melhoramento genético visando à produção de etanol no Estado do Tocantins. In: **Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre-PUC/ABES-RS. 19 p. 2006.

SILVEIRA, M. A. Batata-Doce: uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, 116, p. 699–702, 2014.

SORATTO, A. N., VARVAKIS, G., HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(4), p. 681-687, 2007.

SOUZA, A. F. B. C. **Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce**. Palmas, 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SOUZA, A. F. B. C. Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol, 2005.

SOUZA, V. L. Da produção ao consumo da cachaça artesanal orgânica em Minas Gerais: uma questão de Comunicação Mercadológica. In: **II Conferência Brasileira de Estudos Em Comunicação e Mercado**. O Re-Pensar e o Re-Fazer da Comunicação com o Mercado. São Bernardo do Campo: UESP, p. 1-11, 2012.

SUDAM Assessoria. Tocantins vai inaugurar miniusina que produz etanol a partir da batata doce. [Tocantins, 2014]. Disponível em: < <http://www.novacana.com>>. Acesso em: 23/06/2014.

SURMELY, R. et al. Hidrólise do Amido. In: **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.3, cap.15. p. 377-399, 2002.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA. Universidade Estadual de Campinas. 4º ed. - Campinas: **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação** (NEPA), 2011.

TALBERT, D.M.; SIMS, E.T. HAMMING, M.D. The ethanol production potencial of sweet potato and jerusalem artichoke: A review conducted for the savannah river plant. **Hortscience**, v.18, n.2, p.168, 1983.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 10, p. 1165-1168, 1996.

ÚNICA <http://www.unica.com.br/noticia/32026594920320868796/unica-revisaprojecao-para-safra-2012-por-cento2F2013-por-cento2C-aponta-moagem-maior-porcento2C-mas-queda-na-producao-total-de-acucar-e-etanol-no-centro-sul/>

Universidade Estadual de Campinas. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), 2006.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV **Determination of plant cell-wall constituents**, 157, 1967.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-120, 1967.

VENTORIM, F.; MACHADO, G. Álcool Combustível na Matriz Energética Brasileira. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, SP, v.36, n.2, fev. 2006.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n. 3, 2002.

WOOLFE, J. A. **Sweet potato: an untapped food resource**. Cambridge University Press, 188 p. 1992.

WU, Y.V. Characterization of sweet potato stillage and recovery of stillage solubles by ultrafiltration and reverse osmosis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, n.2, p. 252-256, 1988.

ZAFAR, S.; OWAIS, M. Short communication Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Engineering Journal**, 27, p. 295-298, 2006.

ZHANG, L. et al. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, V. 102, p. 4573-4579, 2011.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J.; GARVALHO, G. G. P. Potencialidade da integração lavoura-pecuária: relação planta-animal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. VII, n. 01, p. 1695-7504, 2006.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TORBET, H. A.; SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland, **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1503-1508, 2009.