

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE POLPA DE MANDIOCA¹

ELONEIDA A. CAMILI² & CLAUDIO CABELLO³

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a inovação do processo de obtenção de etanol a partir da mosturação de raízes da mandioca, onde a etapa de fermentação e caracterização dos produtos utilizou um sistema de produção em escala laboratorial que simulou as operações numa planta industrial. A polpa de mandioca, formada por mandioca *in natura* desintegrada e água, na concentração de 33,5%, foi submetida à hidrólise enzimática pela enzima α -amilase em um reator na temperatura de 90°C por 2 horas e amiloglicosidase a 60°C por 16 horas e posteriormente filtrada em filtro a vácuo. Em seguida, foi utilizada como substrato de processo fermentativo, em diferentes tempos de fermentação e concentrações de levedura. O fermentado foi analisado quanto ao nível de contaminação, ao teor de etanol e açúcares residuais. A análise das variáveis do processo indicou maior produção de etanol no tempo de fermentação de 12 horas e com uma concentração de levedura de 8% m/m sendo que a interação, tempo de fermentação e concentração de levedura influenciou na produção de etanol. Através das melhores condições de trabalho, um ensaio comprobatório em maior escala foi realizado simulando uma escala industrial. Um novo hidrolisado foi produzido com um teor de 281,16 g.L⁻¹ de glicose e um rendimento na conversão a açúcares redutores de 90,44 %, sendo este utilizado como substrato para o processo fermentativo. Este hidrolisado, filtrado e separado dos resíduos lignocelulósicos, foi inoculado com leveduras na concentração de 8% m/m e os resultados indicaram uma concentração no fermentado de etanol de 69,65g.L⁻¹, o que mostrou uma eficiência no processo fermentativo de 78,6%. Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que, a polpa integral de mandioca apresentou-se como promissora matéria-prima para produção de etanol.

Palavras-chave: Etanol, fermentação etanólica, *Manihot esculenta*.

¹ Parte da Tese da 1ª autora intitulada: Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca

² Aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Energia na Agricultura) FCA/UNESP - Fazenda Experimental Lageado. Rua José Barbosa de Barros, 1780. CEP: 18610-307. Botucatu/SP/Brasil. elocamili@hotmail.com

³ Orientador e Docente CERAT/UNESP- Fazenda Experimental Lageado. Rua José Barbosa de Barros, 1780. CEP: 18610-307. Botucatu/SP/Brasil. cabello@fc.unesp.br

ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA PULP

SUMMARY: *This study aimed to contribute to innovation in the objective of obtaining ethanol from the process of mashing cassava roots, where the fermentation step and characterization of the products in a production system that simulates laboratory-scale operations in an industrial plant. The cassava pulp which is made up of fresh cassava and water at a concentration of 33.5% was subjected to enzymatic hydrolysis by the enzyme α -amylase in a reactor at a temperature of 90°C for 2 hours and amyloglucosidase at 60°C for 16 hours and subsequently vacuum filtered. After this process, the hydrolyzate was used as substrate for the fermentation process, with different fermentation times and concentrations of yeast. The fermented mash was then analyzed for levels of contamination, ethanol content and residual sugars. The process of analyzing variables showed high ethanol production for the fermentation time of 12 hours with a yeast concentration of 8% m/m, and the interaction between the fermentation time and the yeast concentration influenced ethanol production. Through better working conditions, an evidentiary test was conducted by simulating an industrial scale which resulting in a new hydrolyzate was produced with a content of 281.16 g.L-1 of glucose and a conversion yield of 90.44%, reducing sugars which are used as a substrate for the fermentation process. This hydrolyzate, filtered and separated from the lignocellulosic wastes inoculated with yeast at concentration of 8% m/m resulted in showing a concentration in the fermentation of ethanol at 69.65 g/l which demonstrated in a fermentation efficiency of 78.6%. Considering these results it was concluded that the whole pulp showed that cassava is a promising raw material for ethanol production.*

Keywords: *Alcohol, fermentation, Manihot esculenta.*

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a mandioca foi vista como matéria-prima para produção de álcool carburante em dois períodos, 1932 – 1945 e 1970 – 1980, entretanto, após isso, não houve seguimento desse uso. Atualmente, a produção de álcool carburante de mandioca é inviável, principalmente em comparação ao processo a partir da cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool refinado a partir de mandioca *in natura* tem obtido o interesse de alguns industriais da área, pois o produto apresenta um maior valor de mercado que o álcool carburante (LEONEL; CABELLO, 2001).

A crescente necessidade de ampliar de modo sustentável o uso de fontes renováveis de energia, para proporcionar maior segurança ao suprimento energético e reduzir os impactos ambientais associados

aos combustíveis fósseis, encontra no bioetanol uma alternativa viável economicamente, e com significativo potencial de expansão. A produção e o uso de bioetanol como combustível veicular são praticados regularmente no Brasil desde 1931, com notável evolução durante as últimas décadas, alcançando maturidade e consistência, segundo um modelo produtivo que pode ser adaptado e implementado em contextos similares (BIOETANOL,2008).

Os primeiros trabalhos sobre produção de etanol combustível a partir de mandioca foram publicados no Brasil na década de 40. Até este período, encontravam-se experiências e estudos isolados, geralmente consequência de particularidades regionais e crises esporádicas de abastecimento de outros combustíveis. Almeida (1991), já num estudo mais técnico, comparou as produções de etanol a partir de cana de açúcar, melaço e mandioca, preconizando esta última à necessidade de um maior desenvolvimento de tecnologia para tornar-se competitiva. Alertou ainda sobre a possibilidade de aproveitamento de terras onde, dada a sua natureza, a cultura de cana fosse pouco recomendada, mas que se prestassem a cultura da mandioca, por ser esta menos exigente.

Esse tema só voltou a ser objeto de estudos mais constantes no final da década de 70, quando voltaram a surgir publicações de pesquisadores do Instituto Nacional de Tecnologia – INT (ARAÚJO, 1975; BIANCO et al, 1976; ARAÚJO, 1981), e do Instituto Tecnológico de Alimentos (MENEZES; LAMO, 1976; MENEZES et al., 1976).

Na década de 80, aumentou consideravelmente a quantidade de estudos visando um melhor conhecimento do processo para produção de etanol a partir de mandioca, e um aprimoramento tecnológico que viabilizasse a sua aplicação.

Apesar destes estudos, o número de instalações industriais foi muito influenciado por questões políticas. No entanto, ao final desta década a maioria das usinas instaladas encontrava-se inoperantes ou dedicadas à produção de álcool de amiláceos em pequena escala e para fins farmacêuticos, devido à falta de catalisadores baratos o que acarretava alto custo de produção (BIOETANOL,2008).

De acordo com Cereda et. al., (2002), dois fatores têm desmobilizado o uso da mandioca para produção de etanol quais sejam: a baixa produtividade agrícola e o maior consumo energético necessário à hidrólise do amido no preparo do mosto.

Na China, o governo vê o etanol proveniente da mandioca como fonte de energia alternativa e, também, principalmente como fonte segura, renovável e não poluente. A mandioca é um produto de grande abundância. O país importa 25% de petróleo para a demanda interna, e calcula-se que em 2015 serão necessário mais de 50%. Por isso, o governo promove o desenvolvimento da produção de etanol de mandioca como a fonte energética do país (ZHANG et. al., 2003).

Quimicamente, o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quando produzido por diferentes matérias-primas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas as im-

purezas que acompanham o álcool que é característico de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto.

Nos últimos anos, vários trabalhos de pesquisa vêm sendo realizados com o objetivo de determinar os melhores parâmetros operacionais para produção de etanol de mandioca. Algumas destilarias brasileiras operam de forma ineficiente, com perdas e rendimentos baixos tanto para o processo de hidrólise, como durante a fermentação. Desta forma, é de se esperar que exista um baixo rendimento operacional dessas destilarias.

Os objetivos deste trabalho foram: estudar o processo de produção de etanol por hidrólise enzimática a partir de raízes de mandioca *in natura*, avaliando a influência de alguns parâmetros operacionais, como o tempo de fermentação, concentrações de levedura sobre o comportamento fermentativo e características dos produtos formados, utilizando um sistema de produção que simulasse as operações numa planta industrial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram raízes de mandioca *in natura* das variedades Fécula Branca e IAC14, com idade de 2 e ½ anos, fornecidas pelo CERAT/UNESP.

2.2. Processo de hidrólise-sacarificação

Para a realização desta etapa foi preparada uma polpa de mandioca, contendo 150 kg de mandioca e água, com um teor de matéria seca de 33,5 %. Para a etapa de liquefação foi utilizado a enzima amilase (Termamyl 120L) na concentração de 3 KNU.4g⁻¹, por 2 horas a 90°C. Na sacarificação foi utilizada a enzima amiloglucosidase (AMG 400L) na concentração de 3 AGU.4g⁻¹, por 16 horas, com temperatura de reação de 60°C. Após o processo de hidrólise-sacarificação, a suspensão foi filtrada em filtro a vácuo marca MF DIMAN-ME, onde o hidrolisado foi separado da parte sólida, resíduos lignocelulósicos. O hidrolisado foi então utilizado como substrato para os ensaios fermentativos.

2.3 Planejamento experimental para a produção de etanol

A produção de etanol, foi estudada mediante modelo estatístico que simulou o processo em planta piloto, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², mais 4 ensaios axiais e 5 repe-

tições no ponto central, totalizando 13 ensaios. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 1. Os pontos centrais (0) serviram para estimar o erro experimental e determinar a precisão da equação polinomial. Os pontos axiais ($\pm\alpha$) foram utilizados para a ampliação do modelo linear, tornando-o um modelo quadrático, sendo o valor de α uma função do número de variáveis independentes (k), e definido pela equação 1 (BARROS NETO et al., 2003).

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (1)$$

Sendo $K = 2$, tem-se que:

$$\alpha = (2^2)^{1/4} = 1,41.$$

Tabela 1- Níveis das variáveis no planejamento experimental para produção de etanol de mandioca

Variáveis		$-\alpha(-1,41)$	-1	0	$+1$	$+\alpha(+1,41)$
Conc. Levedura	% p/p	3,18	4	5	8	8,82
Tempo	Horas	9,54	12	18	24	26,46

2.4 Produção de etanol

A levedura utilizada no processo de fermentação foi a *Saccharomyces cerevisiae* LNF CAT-1, comercializada pela empresa Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves, RS.

Após a diluição do hidrolisado, produzido anteriormente no item 2.2, para 18° Brix e a adição de nutrientes (Cloreto de Magnésio - 20mg, Adubo foliar - 5mg, Uréia- 200mg, Super fosfato - 100mg), cada erlenmeyer recebeu inicialmente 15% do volume total do meio e as concentrações de levedura descritas anteriormente, recebendo o restante do mosto em processo de alimentação de forma contínua, num tempo aproximado de 10 minutos, completando um volume de 500 mL. Os erlenmeyers ficaram sob agitação constante de 100 rpm e temperatura de 30°C pelo tempo determinado em cada ensaio. Decorrido os tempos de cada ensaio, o vinho (mosto fermentado), juntamente com o fermento em suspensão, foi enviado à centrífuga, para separação das células de levedura do vinho delevurado.

2.5 Análise dos ensaios de fermentação

Após cada ensaio de fermentação foram retiradas amostras para posterior análise quanto ao teor de etanol, metanol, glicerol, açúcares residuais, e cálculo da eficiência e viabilidade celular.

As concentrações de etanol, metanol e glicerol e açúcares residuais foram determinados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HP série 1100), empregando-se as seguintes condições: guarda coluna

da BIO RAD n° 125-0131; coluna BIO RAD AMINEX HPX-87H, com detector de índice de refração (IR), eluente água destilada ionizada em coluna de troca iônica, filtrada em filtro de polietileno 0,45µm de poro e em seguida desgaseificada em banho de ultra-som; fluxo do eluente de 0,6mL.min⁻¹; volume da amostra injetada 20µL. As amostras foram filtradas em filtro de membrana (DURAPORE) em PVDF, 0,22µm de poro.

A eficiência da fermentação foi calculada através da equação (2).

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Concentração de etanol produzido}}{\text{Concentração de etanol teórico}} * 100 \quad (2)$$

Concentração de etanol teórico

A contagem direta e determinação da viabilidade celular foi realizada antes e após a fermentação pela técnica de coloração com azul de metileno segundo a metodologia de Lee et al. (1981).

2.6 Análise estatística

Por meio do presente estudo foi possível obter modelos estatísticos capazes de prever o comportamento das variáveis dependentes (respostas) em função das variáveis independentes.

A análise de regressão obtida foi ajustada para cada resposta (φ) através de um polinômio de segunda ordem com as variáveis explicativas (X_k). A expressão geral utilizada para prever o comportamento de cada resposta avaliada pode ser escrita da seguinte forma (equação 3):

$$\varphi = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \varepsilon \quad (3)$$

onde,

φ = função resposta;

X_1, X_2 = valores das variáveis independentes;

β_0 = coeficiente relativo à intercepção do plano com o eixo de resposta;

β_1, β_2 = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

β_{11}, β_{22} , = coeficiente das variáveis quadráticas;

β_{12} = coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

ε = erro experimental.

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do RSREG e do STEP-WISE do sistema SAS versão 8.2. A significância do modelo foi testada pela análise de variância (ANOVA). Foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

2.7. Ensaio comprobatório

Este ensaio teve como objetivo a validação experimental das condições estabelecidas pelas análises estatísticas dos experimentos anteriores.

Um novo hidrolisado foi produzido seguindo as etapas descritas anteriormente no item 2.2, sendo utilizado como substrato para o processo fermentativo. O inóculo foi preparado com 4% de levedura seca e 15% de meio sendo adicionado no fundo do fermentador onde recebeu o restante em filete contínuo. Foi realizado o acompanhamento do Brix até o enchimento da dorna, onde a mesma foi mantida em agitação (100rpm) e a 30°C por 12 h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fermentação alcoólica, o açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura em seu metabolismo para obtenção de energia e gerar etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos (LIMA et al., 2001).

Os resultados experimentais para teor de etanol, glicose, metanol, glicerol e a eficiência da fermentação após o processo de fermentação, de acordo com o planejamento experimental proposto, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores experimentais das variáveis dependentes (respostas) para os fermentados produzidos a partir do hidrolisado de mandioca.

Ensaio	<i>Variáveis independentes</i>		<i>Variáveis dependentes</i>					
	Conc. Levedura (%p/p)	Tempo (h)	Glicose inicial (g.L ⁻¹)	Glicose Final (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Metanol (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Eficiência (%)
1	4(-1)	12(-1)	178,12	0,09	72,42	0,10	17,50	79,57
2	8(1)	12(-1)	178,12	0,64	73,12	0,15	19,56	80,33
3	4(-1)	24(1)	178,12	0,91	61,36	0,09	16,51	67,41
4	8(1)	24(1)	178,12	1,40	73,08	0,10	18,22	80,29
5	3,18(-1,41)	18(0)	178,12	0,60	69,83	0,08	15,56	76,72
6	8,82(1,41)	18(0)	178,12	0,74	70,84	0,61	17,23	77,83
7	6(0)	9,54(-1,41)	178,12	11,49	58,06	0,50	16,47	63,79
8	6(0)	26,46(1,41)	178,12	0,55	57,42	0,77	19,15	63,09
9	6(0)	18(0)	178,12	0,32	71,04	0,11	18,61	78,05
10	6(0)	18(0)	178,12	0,21	71,89	0,12	17,00	78,98
11	6(0)	18(0)	178,12	0,24	72,30	0,13	18,41	79,44
12	6(0)	18(0)	178,12	0,27	72,37	0,14	18,35	79,51
13	6(0)	18(0)	178,12	0,26	72,76	0,11	19,39	79,94

A eficiência da fermentação alcoólica está relacionada com o tempo de fermentação, já que menor quantidade de etanol produzido ficou para os tratamentos 7 e 8. O tempo de fermentação para tratamento 7 não foi suficiente para a metabolização das leveduras, para o tratamento 8, o tempo levou a evaporação do etanol. Segundo Horii (1978), dentre as variáveis que exercem efeito significativo sobre o rendimento ou eficiência da fermentação estão a qualidade da matéria-prima, as condições fisiológicas do inóculo e fatores ambientais como pH, nível inicial de contaminantes, temperatura, concentração do substrato no mosto, composição nutricional do mosto e concentração do álcool produzido. Srikanta et al., (1987), produziram etanol a partir de farelo de mandioca e obtiveram uma eficiência total do processo da ordem de 65,5 % quando fermentaram o xarope, e de 57,3% quando a fermentação ocorreu simultânea a sacarificação tendo sido o mosto acrescentado de 10 % (v/v) de fermento e suplementado com 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 % KH_2PO_4 e 0,02 % de extrato de levedura ao mosto.

3.1 Glicose

Para o teor de glicose residual no vinho observou-se uma variação de $0,09\text{g.L}^{-1}$ a $11,49\text{g.L}^{-1}$ nas diferentes condições experimentais testadas, fato este decorrente ao tempo de fermentação, principalmente no tratamento 7 por ser insuficiente para a metabolização das leveduras. Nos outros tratamentos foi possível verificar que praticamente toda glicose presente no mosto de fermentação foi metabolizada pelas leveduras.

A análise de regressão mostrou efeito quadrático positivo do tempo de fermentação, conforme apresentado na Tabela 3. O modelo ajustado obtido pela análise de regressão apesar de significativo não pode ser considerado preditivo, já que o valor de F calculado (5,91) não é 4 a 5 vezes maior que F tabelado (4,10). O modelo deu origem à equação 4 que determina a concentração de glicose residual no vinho, sendo:

$$Gl = -0,046 - 1,74 * T + 2,30 * T \quad (4)$$

onde: *Gl* = Glicose; *T* = Tempo

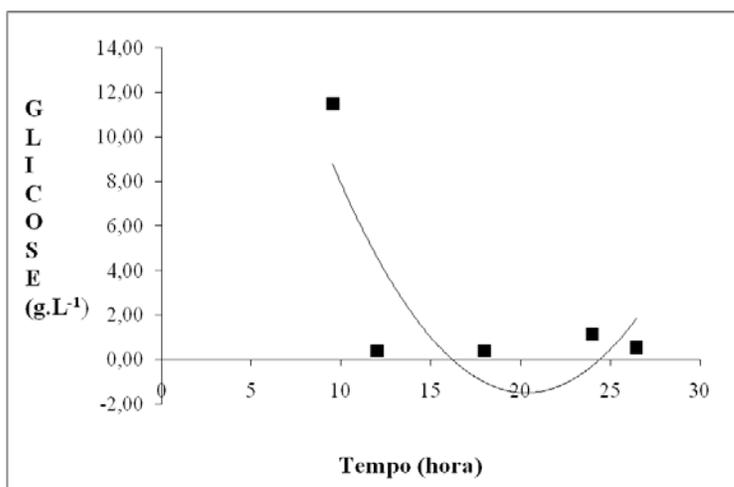
Nas condições de baixo tempo de fermentação o teor de glicose residual no vinho é maior, sendo os menores teores encontrados nas outras condições de tempo (Figura 1).

Tabela 3 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo ajustado para o teor de glicose no vinho fermentado.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	-0.0462			
Tempo (L)	-1.7358	0.8043	1	0.0563
Tempo(Q)	2.2970	0.8579	1	0.0232
R2	0.5418			

ANOVA	GL	SQ	QM	F valor	Pr > F
Regressão	2	61.0248	30.5124	5.91	0.0202
Resíduos	10	51.6020	5.1602		
Total	12	112.6269			

Onde: GL = grau de liberdade.

**Figura 1** - Efeito do tempo sobre a concentração de glicose

3.2 Etanol

Conforme análise estatística o teor de etanol nos diferentes tratamentos variaram de 57,42 g/L a 73,12 g/L. Através da análise de regressão observou-se o efeito quadrático negativo do tempo de fermentação sobre o teor de etanol (Tabela 4). Contudo, o valor de $F_{calculado}$ é de 12,01 e $F_{tabelado}$ de 4,84, o modelo neste caso não pode ser considerado preditivo.

A equação (5) do modelo ajustado para a quantidade de etanol produzida no vinho em relação ao tempo é:

$$E = 72,60 - 5,66 * T^2 \quad (5)$$

onde: E = Etanol; T = Tempo

Tabela 4 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo ajustado para o teor de etanol produzido no vinho fermentado

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	p valor	
Média	72.5893				
Tempo(Q)	-5.6632	1.6339	1	0.0053	
R2	0.5220				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr > F
Regressão	1	224.8646	224.8646	12.01	0.0053
Resíduos	11	205.8842	18.7167		
Total	12	430.7487			

Onde: GL = grau de liberdade.

Os resultados mostraram que o teor de etanol foi menor para tratamentos submetidos ao tempo maior (26,46h) e ao menor tempo (9,54h). Os tratamentos que obtiveram maiores teores de etanol encontravam-se na faixa de tempo entre 12 e 18hs (Figura 2).

Com a análise da Figura 2 ficou constatado que concentrações altas de etanol foram produzidas nas condições de intermediárias de tempo. A duração da fermentação depende de vários fatores, tais como: processo de fermentação, características do mosto e do fermento, condições da fermentação, etc. Desde que se tenha controle de todas estas variáveis, é possível fixar o tempo de fermentação, guardando uma tolerância de mais de menos 2 horas (LIMA, et al., 2001).

Assim, a dilatação exagerada, bem como a redução demasiada do tempo de fermentação constitui irregularidades do processo fermentativo. Uma dilatação exagerada do tempo pode indicar um mosto excessivamente rico em açúcares, uma deficiência quantitativa e qualitativa do fermento, baixa temperatura do mosto, infecção generalizada, etc. A redução demasiada, por sua vez, pode significar uma fermentação incompleta, um mosto muito pobre em açúcares, temperatura muito elevada do mosto, etc. (VENTURINI FILHO; NOGUEIRA, 2010).

Desta forma pode-se dizer que o fator tempo tem grande influência no processo produtivo, ou seja, englobando maior rendimento no final do processo fermentativo. Para fermentação de curto tempo seria insuficiente para a metabolização das leveduras, já para tempos longos de fermentação pode ocorrer uma evaporação do etanol produzido ou uma acetificação decorrente das bactérias presentes.

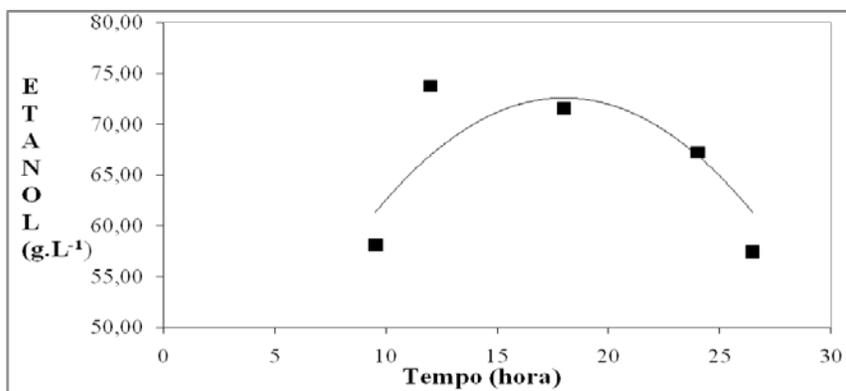


Figura 2 - Efeito do tempo sobre a quantidade de etanol produzida no vinho

3.3 Metanol

Os resultados obtidos na análise de metanol nos vinhos mostraram pequenos teores deste componente com uma variação de 0,08 a 0,77 g.L⁻¹ nos diferentes tratamentos. Apenas no tratamento 8 a quantidade de metanol foi maior que as outras (0,77 g.L⁻¹). A Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho. O modelo ajustado deu origem à equação 6 que determina a concentração de metanol no vinho, sendo:

$$Met = 0,134 + 0,160 * T \quad (6)$$

onde: *Met* = Metanol; *T* = Tempo

Tabela 5 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo ajustado para o teor de metanol produzido nos vinhos fermentados

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0.1337				
Tempo	0.1595	0.0782	1	0.0662	
R2	0.2742				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr > F
Regressão	1	0.1783	0.1783	4.16	0.0662
Resíduos	11	0.4719	0.0429		
Total	12	0.6502			

A Figura 3 mostra que os teores de metanol no vinho aumentam com o tempo de fermentação. A presença de metanol no vinho esta relacionada à degradação das pectinas metoxiladas presentes nas raízes de mandioca. Sendo que a fermentação alcoólica não conduz à formação de metanol nos vinhos. Então, como no processo de produção da polpa integral de mandioca parte das pelúcias da casca acaba indo para o processo, favorecem a ação enzimática para a degradação da pectina e a formação do metanol.

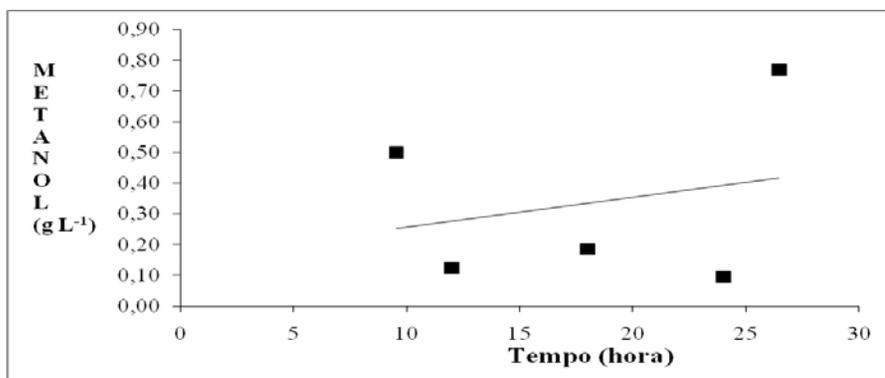


Figura 3 - Efeito do tempo sobre a quantidade de metanol produzido no vinho

3.4 Glicerol

Os resultados obtidos para a análise do teor de glicerol nos vinhos obtidos após os diferentes tratamentos de fermentação mostraram uma variação de 15,56 g.L⁻¹ a 19,56 g.L⁻¹. A Tabela 6 mostra a análise dos coeficientes de regressão para o modelo ajustado. O modelo ajustado deu origem a equação 7 que determina a concentração de glicerol no vinho, sendo:

$$Gli = 17,84 + 0,77 * L \quad (7)$$

onde: *Gli* = Glicerol; *L* = Levedura

Esses resultados mostraram ter ocorrido o efeito linear da concentração de levedura positivo sobre o teor deste composto no vinho, ou seja, quanto maior a concentração de levedura inoculada, maior o teor de glicerol no vinho.

Nordstrom (1966 e 1968), citado por Gutierrez et al. (1991), relatou que a formação de glicerol é dependente do crescimento da levedura, demonstrando que 0,69 gramas de glicerol são formados por grama de matéria seca produzida pela levedura.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo ajustado para o teor de glicerol produzido nos vinhos fermentados

	Coefficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	17.8431				
Levedura (L)	0.7679	0.3956	1	0.0783	
R2	0.2551				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr > F
Regressão	1	4.7030	4.7030	3.77	0.0783
Resíduos	11	13.7337	1.2485		
Total	12	18.4367			

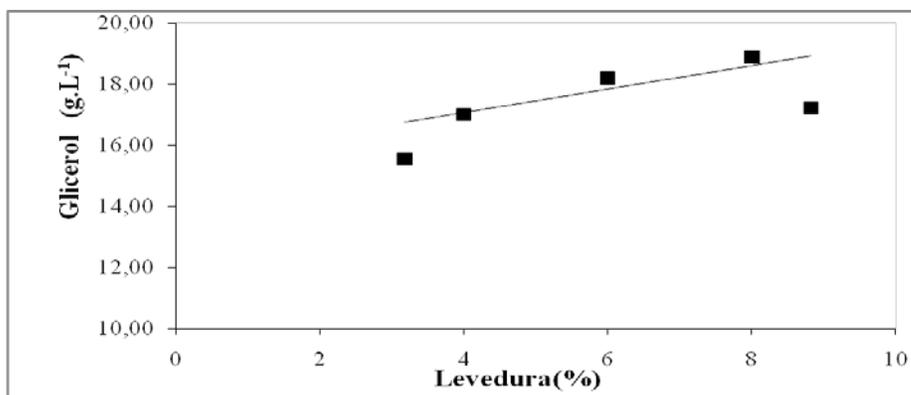


Figura 4 - Efeito da concentração de levedura sobre o teor de glicerol no fermentado de mandioca.

A produção de glicerol na fermentação alcoólica é bastante conhecida e considerada uma fonte de perda de açúcar. Desta forma, vários estudos vêm sendo realizados nas unidades industriais visando determinar quais são os fatores que interferem diretamente na sua produção. Este produto pode corresponder a 8 % do total do açúcar consumido em massa, sendo o terceiro produto mais produzido na fermentação alcoólica, perdendo somente para o etanol e CO₂. Segundo se observa em nível industrial, um dos fatores que pode interferir na produção do mesmo é a pressão osmótica do meio.

De acordo com Lima et al., (2001), a formação do glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação, está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual é alterado quando há formação de ácidos orgânicos, biomassa e a presença de sulfito no mosto. A formação de glicerol também está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico, quando de concentrações elevadas de açúcares ou de sais no mosto. Já Amorim (1977) concluiu que o aumento do pH do meio fermentativo provocava o aumento na produção de glicerol, que é formado pelas leveduras através da via glicolítica. O pH alcalino libera o grupo OH, que reage com o hidreto, necessário para a redução do aldeído a álcool, na reação de óxido-redução, catalisada pela desidrogenase alcoólica. Dessa maneira, o equilíbrio inverso da reação é favorecido (AMORIM, 1977).

Manfroi et al. (2006), a produção de glicerol pode ser afetada pela concentração de açúcar, temperatura de fermentação, pH, linhagem de levedura e quantidade de oxigênio presente.

A quantidade de glicerol formada pode ter sido fortemente influenciada pela linhagem de levedura, que estava adaptada para mostos a base de sacarose, o que acaba causando provavelmente um desvio na rota metabólica e, assim, formando o glicerol. A concentração de glicerol pode ainda ser afetada pela concentração de açúcares, temperatura de fermentação, pH, contaminação bacteriana e quantidade de oxigênio presente. Fatores estes que neste estudo não foram considerados.

3.5 Eficiência

Os resultados obtidos para a análise de eficiência da fermentação após os diferentes tratamentos de fermentação mostraram uma variação de 63 a 80%, sendo este último considerado um nível alto de conversão. A Tabela 7 mostra a análise dos coeficientes de regressão para o modelo ajustado. O modelo ajustado deu origem a equação 8 que determina a porcentagem de conversão de glicose em etanol no vinho:

$$Efic = 79,75 - 6,22 * T^2 \quad (8)$$

onde: *Efic* = eficiência; T = Tempo

Tabela 7 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo ajustado para a eficiência da fermentação alcoólica

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	p valor	
Média	79.7518				
Tempo(Q)	-6.2214	1.7951	1	0.0053	
R2	0.5220				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr > F
Regressão	1	271.3730	271.3730	12.01	0.0053
Resíduos	11	248.5291	22.5936		
Total	12	519.9021			

Na Figura 5 observa-se o comportamento quadrático negativo da eficiência da fermentação alcoólica, evidenciando que nas condições extremas de tempo são obtidos as maiores taxas de conversão. Portanto, o tempo excessivo, bem como, a redução demasiada do tempo de fermentação, constitui irregularidades do processo fermentativo. Um tempo excessivo de fermentação como no caso do tempo de 26,46 horas pode indicar uma infecção generalizada, perda por evaporação, acarretando uma menor formação de etanol. A redução demasiada, por sua vez, pode significar uma fermentação incompleta o que se verificou no tempo de 9,54 horas. Mais precisamente, pode-se afirmar que, para a maximização da produção de etanol (alto rendimento e produtividade), o tempo de fermentação deve estar na faixa de 12 a 18 horas.

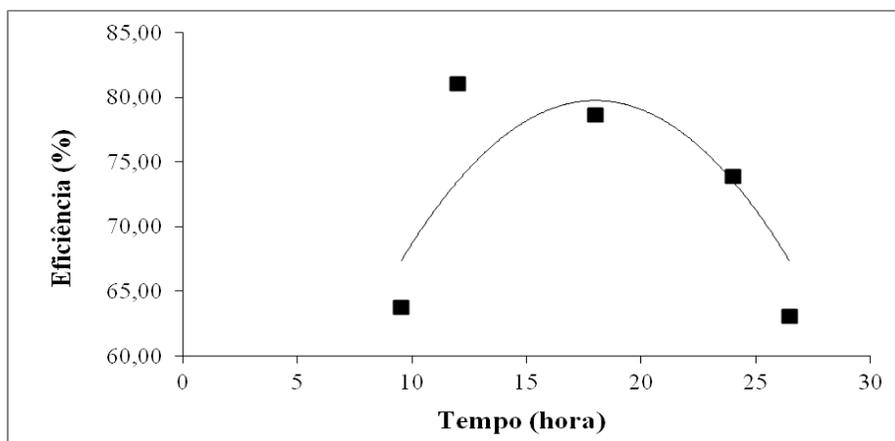


Figura 5 – Eficiência da fermentação alcoólica em relação ao tempo de fermentação

3.6 Viabilidade celular

De acordo com os resultados observados na Tabela 8, foi possível determinar que não ocorreu redução da viabilidade celular durante o período de fermentação, sendo similares em todos os tratamentos.

Segundo Ngang et al., 1992; Oliva-Neto; Yokoya, 1997, o principal indicador de estresse na levedura é a viabilidade celular, sendo a influência da viabilidade celular sobre a contaminação bacteriana é estudada e os principais fatores envolvidos são a concentração de etanol, a competitividade pelo substrato, a atividade de invertase, o estímulo promovido pela autólise de células e excreção de nutrientes.

Tabela 8 - Resultados obtidos em porcentagem para a viabilidade celular

Ensaio	% Inóculo	Células viáveis inicial (Cel.mL ⁻¹)	% Células viáveis inicial	Células viáveis final (Cel.mL ⁻¹)	% Células viáveis final
1	4	4,72E+08	96,79	5,56E+08	100,00
2	8	7,91E+08	96,73	1,01E+09	94,15
3	4	4,65E+08	96,35	5,31E+08	94,44
4	8	7,75E+08	97,64	9,69E+08	96,27
5	3,18	3,03E+08	97,98	3,94E+08	92,65
6	8,82	9,01E+08	98,70	1,03E+09	97,62
7	6	5,97E+08	97,45	7,94E+08	98,45
8	6	5,98E+08	98,40	8,5E+08	93,79
9	6	6,37E+08	99,55	8,06E+08	97,32
10	6	6,47E+08	100,00	7,81E+08	98,43
11	6	6,4E+08	98,91	8E+08	99,22
12	6	6E+08	99,48	8,44E+08	97,83
13	6	6,31E+08	99,51	7,5E+08	95,24

Stupiello e Horii (1981), afirmaram que a reprodução de células pode ocorrer até a temperatura da ordem de 38°C, havendo inibição da multiplicação a 40°C e na presença de 8 a 9% v/v de etanol.

Segundo Cherubin (2003), a relação inversa entre a viabilidade celular da levedura e a contaminação bacteriana ocorre com frequência, sendo sugeridos vários mecanismos que causam inibição da multiplicação ou da atividade fermentativa da levedura.

3.7 Resultados Comprobatórios

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 9, a quantidade de etanol produzido no ensaio comprobatório foi de 69,65g.L⁻¹ com uma eficiência de 78,60%, o resultado foi semelhante ao encontrado nos ensaios preliminares, com relação à concentração de glicose no vinho delevurado o resultado mostrou-se também semelhante ao encontrado anteriormente.

Observando os teores de glicerol e metanol obtidos verificou-se que o comportamento foi semelhante ao realizado em escala laboratorial e indica que a mudança de equipamentos assim como a escalabilidade não afetou o processo fermentativo.

Tabela 9 - Resultados das análises do vinho fermentado

Componentes	Média
Glicose Inicial (g.L ⁻¹)	173,41
Glicose Final (g.L ⁻¹)	0,69
Etanol (g.L ⁻¹)	69,65
Metanol (g.L ⁻¹)	0,33
Glicerol (g.L ⁻¹)	14,06
Eficiência (%)	78,60

Segundo Martinez (2002), a produção de glicerol no processo fermentativo é favorecida por pHs básicos, os quais também favorecem o crescimento de bactérias em detrimento das leveduras que são mais acidófilas. Geralmente, a maior produção de glicerol resulta em menor produção de álcool e menor rendimento do processo.

4 CONCLUSÕES

- Dentro das condições experimentais trabalhadas, os resultados obtidos permitiram concluir que:
- foram consideradas como melhores condições para o processo fermentativo: concentração de 8%, e um tempo de fermentação de 12 horas, com um teor de eficiência em etanol de 80,33%;
 - a análise comprobatória mostrou-se satisfatória diante dos resultados obtidos: concentração de etanol de 69,65 g.L⁻¹, com uma eficiência de etanol de 78,6%;
 - a polpa de mandioca apresentou-se como uma excelente matéria prima para produção de um etanol.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R. Fabricação de álcool de mandioca. In: ABOUTBOUL, H. **Modelagem matemática do processo simultâneo de sacarificação e fermentação alcoólica de farinha de mandioca**. 1991, 190f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)– Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: Planalsucar, 1977, 95 p.
- ARAÚJO, N.Q. Hidrólise enzimática da mandioca. **Informativo do INT**, Rio de Janeiro, p. 42-45, 1975.
- ARAÚJO, N.Q. Tecnologia da fermentação alcoólica dos polissacarídeos. **Informativo do INT**, Rio de Janeiro, p. 15-25, 1981.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 2003, 299 p.
- BIANCO, V.D., et al.,. Álcool de mandioca por fermentação contínua. **Informativo do INT**, Rio de Janeiro, p. 20-26, 1976.

BIOETANOL de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimento sustentável., Cord: BNDES e CGEE, Rio de Janeiro, 2008, 1ª ed. 316 p. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org>. Acesso em 04 mai. 2010.

CEREDA, M., P. Propriedades gerais do amido. In: _____. (Coord.). **Caracterização de matérias primas amiláceas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, v. 1, cap. 5, p.88-100.(Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas).

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

HORII, J. Problemas especiais de fermentação alcoólica: In: HORII, J. **Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1978, p. 70-74.

LEE, S. S.; et al. Rapid determination of yeast viability. **Biothecology Bioengineering Symposium**, New York, 1981, n. 11, p. 641-649.

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: ed. Blucher, 2001, v. 3, cap. 1, p. 1-43.

MANFROI, L. et al. Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videiras conduzidas no sistema lira aberta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2006, v.26 n. 2, abr./jun, p. 290-296.

MENEZES, T. J. B.; LAMO, P. R. Produção de álcool de mandioca. **Boletim do ITAL**, Campinas, v.7, p. 37-54, 1976.

- MENEZES, T.J.B.; et al. Sistemas de hidrólise na produção de álcool etílico da mandioca. Coletânea do ITAL, v.9, p. 209-215, 1976.
- NANG, J.J.E.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, v.14, n.8, p. 741-746, Aug. 1992.
- GUTIERREZ, L.E., et al. Aumento da produção de etanol a partir de melão de cana-de-açúcar pela adição de benzoato. **Anais da ESALQ**, Piracicaba. v.48, p.1-21, 1991.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Micobiologia**, v.28, p. 25-31, 1997.
- SRIKANTA, S. et al. Novel technique for saccharification of cassava fibrous waste for alcohol production. **Starch Starke**, v. 39, n. 7, p. 234 - 37, 1987.
- STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.17, p.43-46, 1981.
- VENTURINI FILHO, W. G., MENDES, B. P.; Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v. 3, cap. 19, p. 530-575. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas).
- ZHANG, C.; et al. Life cycle economic analysis of fuel ethanol derived from cassava in southwest China. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 7, p. 353-366, 2003.