



# **Universidade de Brasília**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA**

**PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE MANDIOCA UTILIZANDO O FUNGO  
*ASPERGILLUS ORYZAE* PARA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DO AMIDO**

**BRASÍLIA, DF  
2014**

IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE MANDIOCA UTILIZANDO O FUNGO  
*ASPERGILLUS ORYZAE* PARA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DO AMIDO**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento**

BRASÍLIA, DF  
2014

IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE MANDIOCA UTILIZANDO O FUNGO  
*ASPERGILLUS ORYZAE* PARA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DO AMIDO**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Alex Leite Pereira  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF  
2014

## RESUMO

Esse estudo teve como objetivo a produção de aguardente de mandioca utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* para liquefação e sacarificação do amido e utilizando levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação alcoólica. Para a hidrólise do amido em açúcares, foi obtida uma massa ralada de mandioca, que foi incubada com o fungo *Aspergillus oryzae* que é um produtor natural de enzimas amilolíticas. Foi obtido um valor de 13,03 Brix e 6,80% de açúcares redutores na mandioca hidrolisada. Esses valores podem ser considerados baixos, sendo que um conteúdo de açúcares em torno de 16% é considerado adequado para o processo fermentativo. A hidrólise enzimática do amido da mandioca precisa ser melhorada para produzir um maior teor de açúcares fermentescíveis e assim aumentar o teor alcoólico do fermentado e o rendimento do destilado. A matéria hidrolisada foi, posteriormente, submetida à fermentação alcoólica, usando fermento comercial da marca FERMENTIS<sup>®</sup>, contendo leveduras da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*. O destilado foi obtido por um processo de dupla destilação, com separação das frações cabeça, coração e cauda. A fração coração do destilado apresentou teor alcoólico de 54<sup>o</sup>GL. O destilado foi analisado quanto aos teores de acidez volátil, aldeídos, ésteres, metanol, álcoois superiores, furfural e cobre. De acordo com os resultados, a aguardente de mandioca apresentou teor de metanol acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Além disso, as concentrações de álcoois superiores encontradas na aguardente de mandioca também estavam em desacordo com a legislação vigente. Estas concentrações podem ser corrigidas por meio de melhorias no processo. Assim, verificou-se que os processos de produção de aguardente de mandioca necessitam de ajustes para reduzir os níveis de metanol, de álcoois superiores e para obter melhores rendimentos.

**Palavras chave:** aguardente de mandioca, *Aspergillus oryzae*, enzimas amilolíticas, fermentação alcoólica, destilação.

## ABSTRACT

The aim of this study was the production of cassava spirit using *Aspergillus oryzae* for liquefaction and saccharification of starch and using commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation. For the hydrolysis of starch into sugars, it was obtained a grated mass of cassava, which was incubated with the fungus *Aspergillus oryzae*, which is a natural producer of amylolytic enzymes. A Brix value of 13.03 and 6.80% of reducing sugars was obtained from hydrolyzed cassava. These values can be considered low and sugar content of around 16% is considered adequate for the fermentation process. Enzymatic hydrolysis of cassava starch must be improved to produce higher levels of fermentable sugars and thus increase the alcohol content of fermented and the yield of distillate. The hydrolyzed material was later submitted the fermentation by using trademark FERMENTIS<sup>®</sup> yeast containing yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The distillate was obtained by a double distillation process, with separation of the fractions head, heart and tail. The heart of the distillate fraction showed alcohol content of 54°GL. The distillate was analyzed for concentrations of volatile acids, aldehydes, esters, methanol, higher alcohols, furfural and copper. According to the results, the spirit of cassava showed methanol content above the limits imposed by Brazilian law. Additionally, the concentrations of higher alcohols found in cassava spirit were also in disagreement with the current legislation. These concentrations can be corrected through improvements in the process. In conclusion, it was found that the processes of production of cassava spirit need to be adjusted to reduce the levels of methanol, higher alcohols and to obtain better yields.

**Keywords:** cassava spirit, *Aspergillus oryzae*, amylolytic enzymes, alcoholic fermentation, distillation.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução com revisão de literatura.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.1. A mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) e sua importância no Brasil.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.2. O amido da mandioca e as enzimas que hidrolisam o amido.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.3. <i>Aspergillus oryzae</i>.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>1.4. Aguardente de mandioca.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.5. Processos de destilação e análises físico-químicas do destilado.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2. Objetivo geral.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.1. Objetivos específicos.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>3. Justificativa.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>4. Materiais e métodos.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>4.1. Preparo da matéria-prima.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>4.2. Liquefação e sacarificação do amido da mandioca.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>4.3. Fermentação alcoólica.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>4.4. Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de mandioca.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>4.5. Destilação do fermentado alcoólico de mandioca.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>4.6. Análises físico-químicas da aguardente de mandioca.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>5. Resultados e discussão</b>  |           |
| <b>5.1. Obtenção do mosto de fermentação através da hidrólise enzimática do amido da mandioca pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>.....</b> | <b>26</b> |
| <b>5.2. Fermentação alcoólica do mosto de mandioca.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5.3. Destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de mandioca .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>6. Conclusão .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>7. Referências bibliográficas .....</b>  | <b>36</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1: Regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade da tiquira (BRASIL, 2008). .....</b> | <b>26</b> |
| <b>Tabela 2: Análises físico-químicas da mandioca triturada e do mosto de mandioca. ....</b>                               | <b>27</b> |
| <b>Tabela 3: Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de mandioca.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>Tabela 4: Análises físico-químicas do destilado de mandioca (fração coração).....</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>Tabela 5: Análises cromatográficas do destilado de mandioca.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>Tabela 6: Temperatura das 6 etapas do processo da primeira destilação do fermentado alcoólico de mandioca.....</b>      | <b>35</b> |

## **LISTA DE FIGURAS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1: Estruturas moleculares da linamarina e lotaustralina.....</b>               | <b>10</b> |
| <b>Figura 2: Estrutura do amido, apresentando estrutura da amilose.....</b>              | <b>12</b> |
| <b>Figura 3: Foto do processo de destilação do fermentado alcoólico de mandioca.....</b> | <b>24</b> |
| <b>Figura 4: Foto da mandioca triturada após incubação com o fungo.....</b>              | <b>28</b> |

## **LISTA DE ANEXOS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo 1: Laudo das análises da aguardente de mandioca.....</b> | <b>45</b> |
|---|-----------|



## 1. Introdução com revisão de literatura

### 1.1. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e sua importância no Brasil

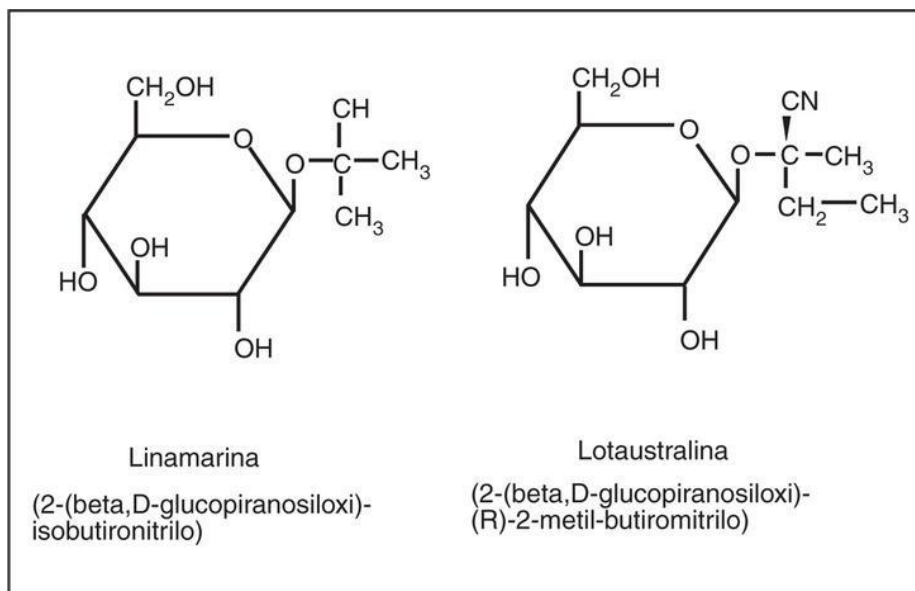
A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz nativa do Brasil e mesmo antes da chegada dos europeus à América, já estava disseminada para o cultivo alimentar, apresentando diversas variedades. Cultivada em todos os estados brasileiros, sua produção tem sido dirigida tanto para o consumo direto como para a indústria de processamento (CENI et al., 2009; COSTA, 2010; OLIVEIRA, 2011; VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

A mandioca desempenha um importante papel na dieta alimentar dos brasileiros, apresentando elevado teor de amido e alto valor energético. As raízes de mandioca apresentam uma composição média de 64 – 70 % de umidade, 24 – 39 % de amido, 0,9 – 1,1 % de cinzas, 1,2 – 1,8% de proteínas, 0,3 – 2,4 % de lipídeos e 0,1 – 0,5 % de fibras (CENI et al., 2009; VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

Mandioca de mesa, mandioca mansa, aipim ou macaxeira são denominações populares de variedades de mandioca com baixos teores de compostos cianogênicos na polpa das raízes. Para consumo direto, a principal exigência é que as variedades apresentem teores de ácido cianídrico (HCN) abaixo de 50 ppm ou 50mg de HCN por quilograma de raízes frescas. A essa exigência principal, somam-se outras características que determinam a qualidade do produto em face das exigências do consumidor e neste caso, destacam-se, tempo de cozimento, qualidade da massa cozida, ausência de fibras na massa cozida e facilidade de descascamento das raízes (CENI et al., 2009; MATTOS & CARDOSO, 2003; OLIVEIRA, 2011).

Os glicosídeos cianogênicos são um grupo de compostos secundários de plantas, contendo compostos nitrílicos que produzem cianeto (cianogênese) após a sua degradação enzimática. As funções dos glicosídeos cianogênicos continuam a serem determinadas em muitas plantas e provavelmente, fazem parte do sistema de defesa contra herbívoros, insetos e moluscos. Estima-se que 3.000 espécies de plantas produzem glicosídeos cianogênicos, incluindo espécies importantes para a alimentação humana, como sorgo, amêndoas e feijões (não domésticos). Entretanto, a espécie agronomicamente mais importante das culturas produtoras de glicosídeos cianogênicos é a mandioca (BENEVIDES et al., 2011).

Todos os tecidos de mandioca, com a exceção de sementes, contêm os glicosídeos cianogênicos, linamarina (> 90% dos compostos cianogênicos) e lotaustralina (< 10% dos compostos cianogênicos) (Figura 1). As folhas têm os mais altos conteúdos de glicosídeos cianogênicos (5,0 g linamarina/kg de peso fresco), enquanto que as raízes têm níveis 20 vezes menores de linamarina. Há também diferenças específicas em relação ao conteúdo de glicosídeos cianogênicos entre os diferentes tipos de cultivares. Geralmente os níveis linamarina variam de 100 mg linamarina/kg de peso fresco para as cultivares de baixo conteúdo de glicosídeos cianogênicos a 500 mg linamarina/kg de peso fresco para as cultivares de alto conteúdo de glicosídeos cianogênicos. Não há cultivares de mandioca, no entanto, isentos de glicosídeos cianogênicos (BENEVIDES et al., 2011, SANT'ANA&DOMENE, 2008).



Fonte: <http://zl.elsevier.es/imatges/12/12v51n07/grande/12v51n0713066801tab02.gif>

**Figura 1: Estruturas moleculares da linamarina e lotaustralina**

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca, perdendo apenas para a Nigéria. A produção anual de mandioca em 2008 foi de 26,7 milhões de toneladas em uma área plantada de quase 1,9 milhões de hectares, com rendimento médio de 14,1 toneladas por hectare (NETO & MARCOLAN, 2010; OLIVEIRA, 2011).

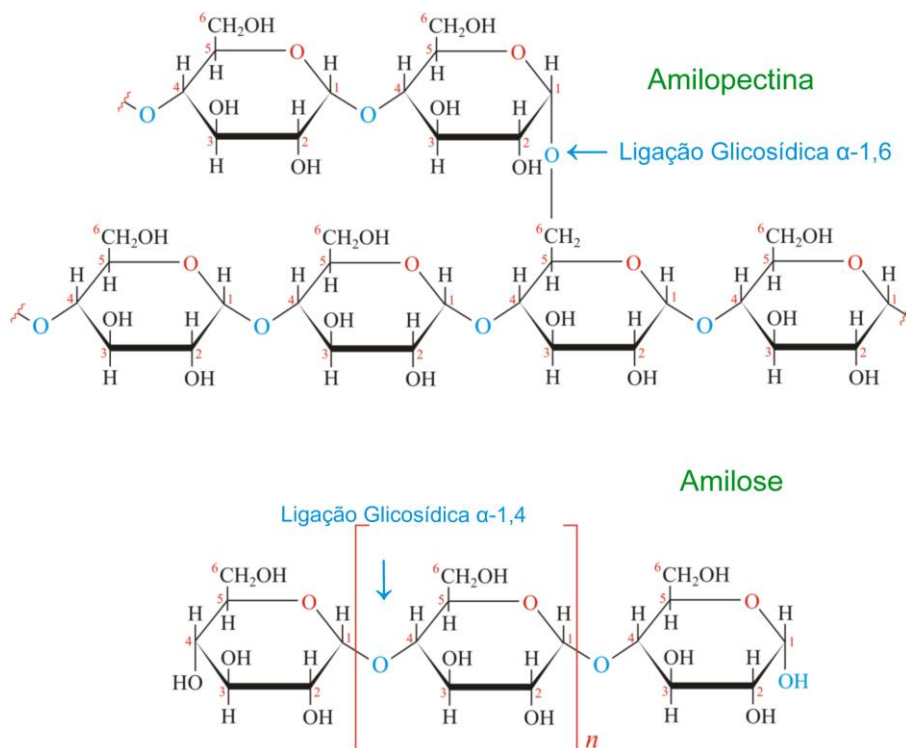
Na distribuição da produção pelas diferentes regiões do país, a Região Nordeste sobressai-se com uma participação de 34,7% da produção, porém com rendimento médio de apenas 10,6 toneladas por hectare. A mandioca tem papel

importante na geração de emprego e de renda, notadamente nas áreas pobres da região Nordeste. Na região Nordeste, além do uso constante para o consumo humano, tanto na forma in natura quanto de derivados, a raiz é largamente utilizada na alimentação animal. Por ser uma cultura rústica, apresenta boa adaptabilidade às condições adversas de clima que caracterizam a região (NETO & MARCOLAN, 2010; MATTOS & CARDOSO, 2003; OLIVEIRA, 2011).

Nas demais regiões as participações na produção nacional sendo na região Norte de 25,9%, região Sul de 23,0%, Sudeste de 10,4% e Centro-Oeste de 6,0%. As Regiões Nordeste e Norte destacam-se como principais produtoras e consumidoras, sendo a produção essencialmente utilizada na dieta alimentar, na forma de farinha. Nas Regiões Sul e Sudeste, em que os rendimentos médios são de 18,8 t/ha e 17,1 t/ha, respectivamente, a maior parte da produção é orientada para a indústria, principalmente nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (NETO & MARCOLAN, 2010, MATTOS & CARDOSO, 2003; OLIVEIRA, 2011).

## **1.2. O amido da mandioca e as enzimas que hidrolisam o amido**

O produto de maior valor agregado da mandioca é o amido, um carboidrato encontrado em abundância na natureza. Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto de unidades de D-glicose, constituído por duas porções distintas: amilose e amilopectina. Esses dois componentes do amido diferem-se entre si, quanto ao peso molecular, ao grau de polimerização de suas cadeias e à disposição dos mesmos no interior do grânulo. A amilose é um polissacarídeo linear formado por unidades de glicoses unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 representa a região ramificada do amido e além das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, possui ramificações mediante ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 (Figura 2) (COSTA, 2010; OLIVEIRA; 2011; RIBEIRO, 2011).



Fonte: <http://cdn1.askiitians.com/Images/2014728-16433398-1348-starch.png>

**Figura 2: Estrutura do amido, apresentando estrutura da amilose (polímero linear composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6))**

Quando aquecidos na presença de água, os amidos formam géis estáveis. O fenômeno de gelatinização do amido ocorre quando os grânulos são aquecidos em água à temperatura característica para cada fonte de amido, que varia de 60 a 70°C. Devido essa propriedade, este carboidrato tem grande importância na indústria, sendo utilizado como ingrediente de vários produtos alimentícios, podendo fornecer textura e servir como espessante (COSTA, 2010; OLIVEIRA; 2011; RIBEIRO, 2011).

O amido de mandioca é facilmente extraído, já que as raízes contêm pequenas quantidades de proteínas, gorduras e outros componentes. Dessa forma, o processo de extração é simples e o amido obtido é puro e branco. Devido ao baixo conteúdo de lipídeos (<0,1%), o amido de mandioca e seus derivados não apresentam o sabor e aroma de cereais, o que é desejável para muitos produtos alimentícios (ADEJUMO et al., 2011; OLIVEIRA; 2011).

A pasta de amido de mandioca gelificada é viscosa e transparente, dentre os amidos de raízes e tubérculos, o da mandioca é um dos que apresenta a menor temperatura inicial de gelatinização, em torno de 60°C. O amido de mandioca destaca-se em relação aos demais amidos em virtude de sua alta capacidade de

retenção de água, baixa temperatura de gelatinização e por não apresentar odor característico, como acontece com os amidos extraídos de cereais. Devido essas suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, o amido de mandioca tem grande desta que na indústria (ADEJUMO et al., 2011; OLIVEIRA; 2011).

O amido pode ser utilizado na sua forma natural ou, por intermédio de processamentos adicionais, para dar origem a amidos modificados, xaropes de glicose, maltose ou frutose e maltodextrinas (ADEJUMO et al., 2011; OLIVEIRA; 2011).

A hidrólise do amido pode ser catalisada pelas enzimas amilolíticas. A  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) é uma enzima que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia de amido, ou seja, ocorre a hidrólise da cadeia linear do amido (amilose). A hidrólise da solução de amido gelificado pela alfa-amilase em polissacarídeos de menor peso molecular provoca uma rápida diminuição da viscosidade da pasta de amido e perda da capacidade de coloração por iodo. A diminuição da viscosidade da solução é chamada de liquefação do amido (PANDEY et al., 2005; PEIXOTO et al., 2003).

A amiloglicosidase, também conhecida como glicoamilase (EC. 3.2.1.3) tem capacidade de hidrolisar tanto ligações  $\alpha$ -1,4 como as ligações  $\alpha$ -1,6 da cadeia de amido, ou seja, tem a capacidade de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, embora em uma razão menor que as ligações  $\alpha$ -1,4, fornecendo quase a degradação completa do amido em glicose. Esta ação resulta na formação de glicose, monossacarídeo que aumenta a doçura da solução, motivo pelo qual a amiloglicosidase é chamada de enzima sacarificante (PANDEY et al., 2005).

As enzimas amilolíticas ocorrem em muitos microrganismos, principalmente em fungos filamentosos e bactérias. Devido à facilidade de cultivo e às desejáveis propriedades físico-químicas das enzimas, certas espécies de *Aspergillus* e *Bacillus* são quase exclusivamente usadas para a produção de amilase comercial (DJEKRIF-DAKHMOCHE et al., 2006; PANDEY et al., 2005; NOROUZIAN et al., 2006). O uso de fungos do gênero *Aspergillus* como *A. niger* e *A. oryzae* apresenta vantagens tecnológicas como facilidade de manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos, além de serem micro-organismos GRAS (Generally Recognized As

Safe),ou seja, reconhecidos como seguros para a produção de alimentos (ABDULLAH et al., 2011).

### **1.3. *Aspergillus oryzae***

*Aspergillus oryzae* é um fungo filamentososo que tem capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas hidrolíticas, incluindo enzimas amilolíticas, proteases beta-galactosidase, lipases, celulase, glutaminase e metalopeptidase. O fungo *Aspergillus oryzae* é utilizado há centenas de anos na indústria de fermentação japonesa na produção de alimentos fermentados tradicionais como *sake* (bebida alcoólica japonesa), *miso* (pasta de soja), *shoyu* (molho de soja) e vinagre (MACHIDA et al., 2008; U.S. Environmental Protection Agency, 2014).

*A. oryzae* é geneticamente muito similar ao *A. flavus*, esse fungo é genomicamente bem caracterizado e considerado um microrganismo de segurança para a produção de enzimas para uso em alimentos, porque não tem a capacidade de produzir aflatoxina ou quaisquer outros metabólitos cancerígenos (MACHIDA et al., 2008; U.S. Environmental Protection Agency, 2014).

Uma das características peculiares do uso de *A. oryzae* na fermentação tradicional japonesa é o cultivo em estado sólido. A fermentação em estado sólido (FES) aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos, principalmente fungos, sobre substratos sólidos umedecidos (arroz, soja e farelo de trigo), mas sem a presença de água livre circulante. A baixa umidade na FES torna os microrganismos capazes de produzirem certas enzimas, que normalmente não seriam produzidas na fermentação submersa (ABE et al., 2012; CHANCHAROONPONG et al., 2012; FRANCIS et al., 2002).

O *koji* é um exemplo típico de FES e consiste em uma massa umidificada de um cereal cozido (na maior parte dos casos, arroz) na qual houve o crescimento de *Aspergillus oryzae* e conseqüentemente a produção de um complexo enzimático. No Japão, o *koji* é o ingrediente essencial para a produção dos alimentos fermentados como *shoyu*, *miso* e *sake*. Para a produção do *sake* que é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de arroz, o amido do arroz deve ser sacarificado pelo *Aspergillus oryzae*. O fungo *A. oryzae* tem a capacidade de hidrolisar o amido em açúcares e as proteínas em peptídeos e aminoácidos, os quais podem ser

posteriormente fermentados por leveduras para a produção de álcool (ABE et al., 2012; CHANCHAROONPONG et al., 2012; MIGUEL, 2011).

#### **1.4. Aguardente de mandioca**

Bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas são preparadas na América do Sul desde os tempos pré-colombianos. Os ameríndios preparavam diversas bebidas a partir de produtos amiláceos como milho e mandioca. A maioria das bebidas, fermentadas ou não, a base de mandioca, tem a região Amazônica como origem (CEREDA, 2005).

No Brasil, a tiquira é uma aguardente de mandioca apreciada nas regiões norte e nordeste do Brasil, com maior produção no estado do Maranhão. O nome tiquira tem origem no Tupi e vem da palavra *tykir*, que significa cair gota a gota, uma referência ao processo de destilação. É uma bebida originária da cultura indígena, a partir do fermentado cauim (bebida alcoólica fermentada de mandioca ou de milho) (CEREDA, 2005; RIBEIRO, 2011).

A tiquira encontra-se dentro da legislação brasileira como uma aguardente, com graduação alcoólica de 36 a 54 % em volume, obtida de destilado alcoólico simples de mandioca ou pela destilação de seu mosto fermentado. Entre as bebidas derivadas da mandioca, apenas a tiquira possui legislação específica (BRASIL, 2009; BRASIL, 2008).

Aguardentes são bebidas fortemente alcoólicas, obtidas pela fermentação e posterior destilação de mostos açucarados, oriundos do caldo e de macerados vegetais ou não. Assim, a definição de aguardente é genérica, e, como tal, pode-se encontrar aguardentes de frutas como laranja, uva e banana, aguardentes de cereal como cevada, milho e arroz e aguardentes de raízes e tubérculos como beterraba, mandioca e batata e aguardentes de colmos como cana-de-açúcar e bambu (BRASIL, 2009; BRASIL, 2008).

Para produzir álcool a partir do amido, são necessárias as etapas de gelificação do amido, com a posterior liquefação e sacarificação em açúcares simples, fermentação alcoólica e destilação. A necessidade de transformação de amido de mandioca em açúcares simples decorre do fato de que as leveduras de fermentação alcoólica como *Saccharomyces cerevisiae* não possuem enzimas amilolíticas. A sacarificação biológica se faz por ação enzimática do malte ou pela

ação de enzimas de certos fungos. Para produzir álcool a partir do amido, são necessárias as etapas de gelificação do amido, liquefação e sacarificação em açúcares, fermentação alcoólica e destilação. Por meio desse processo se dá a produção da tiquira (CEREDA, 2005; RIBEIRO, 2011).

Toda a produção de tiquira (aguardente de mandioca) tem sido elaborada de forma artesanal por pequenos produtores individualmente ou agrupados em cooperativas. Sua comercialização é feita no mercado informal, principalmente no estado do Maranhão, em sua quase totalidade a granel. Não há dados estatísticos de produção e registro de produtores no ministério da Agricultura. Apesar da importância, a tiquira vem desaparecendo do Maranhão, sem condições de competir com os baixos preços da aguardente de cana que vem do Sudeste. Grande parte dessa falta de competitividade deve-se ao processo artesanal de produção, que aumenta muito o custo (CEREDA, 2008).

No processo tradicional de fabricação da tiquira, a transformação de amido da mandioca em açúcares (liquefação e sacarificação) é feita por bolores autóctones, provenientes do meio ambiente de produção. As raízes de mandioca, após serem lavadas e descascadas, são raladas e prensadas. A massa prensada é esfarelada e distribuída sobre a superfície de uma chapa quente aquecida à lenha para formar bolos de 30 cm de diâmetro e 3 a 4 cm de espessura. Pelo aquecimento uniforme de ambos os lados do bolo, haverá a gelificação do amido próximo às superfícies externas, resultando na formação do beiju. Os beijos são colocados em local sombreado e com atmosfera úmida, o que permite a proliferação espontânea dos esporos e dos fungos naturais do ambiente. Os fungos que crescem de forma predominante nos beijos são: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Neurospora sitophila*. No início, os bolores crescem apenas superficialmente e, depois de alguns dias, o micélio penetra no interior do beiju, hidrolisando o amido através da atividade de enzimas amilolíticas exógenas (CEREDA, 2008; CEREDA, 2005; RIBEIRO, 2011; VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

A fermentação alcoólica também é feita por leveduras autóctones. Os beijos contendo amido liquefeito e sacarificado são cortados e colocados em fermentadores rústicos, normalmente cochos de madeira e em seguida são cobertos com água. A mistura do beiju com água dá origem ao mosto (uma massa desfeita e xaroposa que deve ser mexida e agitada para se uniformizar e arejar o mosto). A



fermentação alcoólica ocorre por um processo natural feito por micro-organismos presentes no beiju, na água e na parede interna dos cochos. Terminada a fermentação alcoólica, o meio fermentado é coado para a separação dos sólidos insolúveis. Estes, quando presentes na destilação, sofrem pirólise na caldeira do destilador, afetando negativamente a qualidade do destilado. A bebida é destilada em alambiques de barro ou de cobre para dar origem à tiquira (CEREDA, 2008; CEREDA, 2005; RIBEIRO, 2011; VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

O processo tradicional de fabricação da tiquira é artesanal, as cepas são colhidas ao acaso e não existe técnica de controle do processo, gerando desvantagens como baixo rendimento e produto final sem padrão de qualidade. Para alterar esse panorama, o processo deve ser modernizado, com aplicação de tecnologia de fermentação.

### **1.5. Processos de destilação e análises físico-químicas do destilado**

A destilação é o processo de volatilizar líquidos pelo aquecimento e em seguida condensar com o objetivo de promover a separação, concentração e purificação dos compostos voláteis, dando origem ao destilado. O princípio da destilação de bebidas alcoólicas se baseia na diferença entre o ponto de ebulição da água (100°C) e do álcool (78,4°C). A mistura hidro alcoólica apresenta ponto de ebulição variável em função do grau alcoólico. Assim, o ponto de ebulição de uma solução hidro alcoólica é intermediário entre aquele da água e do álcool e será tanto mais próximo do álcool quanto maior for o grau alcoólico da solução (CAMPOS, 2011; RIZZON & MENEGUZZO, 2008).

A bebida destilada compõe-se de água e álcool etílico em maiores proporções. E a fração minoritária é composta pelos “componentes secundários” ou congêneres, substâncias essas responsáveis pelo sabor e aroma das aguardentes. Os principais componentes secundários são: aldeído acético, ácido acético e ésteres desses ácidos, furfural e álcoois superiores. A fração álcool não volátil é basicamente representada pelo teor de álcoois superiores como o amílico, isoamílico, butílico, isobutílico, propílico e isopropílico. Os álcoois superiores são quantitativamente o maior grupo de compostos responsáveis pelo aroma em todos os destilados (CAMPOS, 2011; CANCELIER et al., 2013; MOREIRA et al., 2012).

No processo de fermentação, ocorre a ação de enzimas de certos microrganismos, com destaque para as leveduras, transformando os açúcares do mosto em etanol, gás carbônico, glicerina e outros produtos formados em quantidades menos relevantes, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores. Na destilação do mosto fermentado, ocorrem reações, como: hidrólise, esterificação e produção de furfural. As quantidades verificadas desses compostos secundários variam entre as bebidas destiladas e a sua formação depende dos seguintes fatores: características próprias do mosto fermentado; definição das frações de corte na destilação; tipo e tamanho do destilador; temperatura e tempo da destilação; material de fabricação do alambique ou coluna e a limpeza do destilador (ALCARDE et al., 2010).

Os componentes voláteis do mosto fermentado possuem diferentes graus de volatilidade, o que possibilita a separação dos mesmos através do processo de destilação. Assim, os componentes mais voláteis são recolhidos na primeira fração do destilado denominado de “cabeça” e os menos voláteis nas frações finais do destilado, denominado de “cauda”. A porção intermediária é conhecida como “coração” e constitui a principal fração do destilado. A primeira e a última fração (cabeça e cauda) são ricas em substâncias indesejáveis, devendo, portanto, ser eliminadas ou recicladas, pois além de serem prejudiciais à saúde do consumidor, podem comprometer a qualidade da bebida. A separação das frações do destilado é feita através de cortes, sendo os primeiros destilados denominados fração cabeça que corresponde a cerca de 5 a 10% do volume total teórico de destilado e que deve ser descartada. Em seguida recolhe-se a fração coração até que o grau alcoólico do destilado fique em torno de 42°GL. Logo em seguida começa a destilar a fração cauda (ALCARDE et al., 2010; CAMPOS, 2011).

A cabeça é a fração do destilado formada, principalmente, por compostos voláteis de ponto de ebulição inferior ao álcool etílico (correspondente a 5 a 10% do volume total do líquido a ser destilado). São componentes característicos da cabeça o metanol, os aldeídos (aldeído acético) e os ésteres (acetato de etila). A não separação da fração da cabeça pode acarretar em destilados com alto teor de metanol e aldeído acético que são tóxicos e tem limite máximo estabelecido na legislação e com concentrações elevadas de ésteres, que podem conferir um sabor

enjoativo e desagradável ao destilado (ALCARDE et al., 2010; ASQUIERI et al., 2009; CANCELIER et al., 2013; RIZZON & MENEGUZZO, 2008).

A fração coração é formada por um conjunto de componentes cujo ponto de ebulição varia entre 78,4 a 100°C. A fração intermediária ("coração"), com teor alcoólico variável de 42 a 48%, corresponde à porção mais importante do destilado, pois apresenta a maior quantidade de álcool etílico. É a fração de melhor qualidade, correspondendo a 80% do destilado total. A fração da cauda é formada por um conjunto de compostos, como ácido acético e furfural, recolhidos no final da destilação, cujo ponto de ebulição é superior a 100°C e corresponde a cerca de 10% a 15% do volume final do destilado total (ALCARDE et al., 2010; ASQUIERI et al., 2009; CANCELIER et al., 2013; RIZZON & MENEGUZZO, 2008).

Foi evidenciado que a maneira de destilar, depois da natureza e da composição dos mostos fermentados, é um dos fatores mais importantes do processo e que mais influi na composição dos componentes secundários da bebida destilada. Alterando-se apenas o sistema de destilação, mostos fermentados iguais, destilados no mesmo equipamento, produzem destilados de qualidade diferente. A destilação mais lenta conduz a um maior rendimento, diminui a acidez e aumenta o teor de componentes secundários, proporcionando mais aroma ao destilado devido à riqueza em ésteres e álcoois superiores. A destilação rápida, além de diminuir o rendimento, leva à obtenção de destilado mais ácido e com menos componentes secundários. A passagem dos componentes da cauda, como o ácido acético, para o destilado pode acontecer na destilação rápida, quando a ebulição é mais intensa, uma vez que determinados constituintes são arrastados (AQUARONE et al., 1986; DANTAS et al., 2007; RIZZON & MENEGUZZO, 2008).

A maioria dos produtores de bebidas destiladas realiza o processo de destilação em uma etapa única. Outro processo que pode ser realizado é o da dupla destilação da aguardente, o qual influencia de modo positivo as características físico-químicas da bebida, com redução nos teores de cobre e acidez acética. No processo de bidestilação, a primeira destilação é geralmente conduzida até que o destilado apresente um teor alcoólico entre 25 e 27°GL. Esse primeiro destilado é então submetido a uma nova destilação, onde são separadas as frações cabeça, coração e cauda. A fração coração, neste caso, apresenta um teor alcoólico maior do que a fração correspondente da bebida destilada obtida pela forma tradicional.

Esta fração pode ser consumida após ser diluída ou envelhecida. Os processos de produção de conhaque e uísque utilizam metodologias de dupla destilação, sendo estas, mais indicadas quando se visa à qualidade química e sensorial do destilado final (ALCARDE et al., 2009; BIZELLI et al., 2000; ROTA & FARIA, 2009).

Um importante instrumento de controle da qualidade e identificação das bebidas destiladas são as análises físico-químicas. Uma boa aguardente, além de atender às exigências legais com relação à sua composição, deve também, apresentar qualidades sensoriais capazes de satisfazer as expectativas de seus consumidores (JANZANTTI, 2004).

Algumas substâncias são indesejáveis nas bebidas destiladas, devido a sua alta toxidez e potencial carcinogênico. As principais substâncias, também denominadas contaminantes, que oferecem perigo para a saúde humana e que podem comprometer a qualidade sensorial de bebidas destiladas podem ter origem orgânica (álcool butílico, álcool sec-butílico, acroleína, carbamato de etila, diacetil e metanol) ou inorgânica (arsênio, chumbo e cobre) (ALVARENGA, 2011).

A legislação brasileira (BRASIL, 2008) definiu quantidades máximas permitidas de alguns contaminantes na aguardente de cana de açúcar que não estavam antes previstos na legislação como, por exemplo, carbamato de etila ( $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ ), acroleína ( $5 \text{ mg.100 mL}^{-1}$  de álcool anidro), álcool sec-butílico ( $10 \text{ mg.100 mL}^{-1}$  de álcool anidro), álcool n-butílico ( $3 \text{ mg.100 mL}^{-1}$  de álcool anidro), chumbo ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e arsênio ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

O metanol ou álcool metílico é um álcool indesejável na bebida destilada, devido a sua alta toxidez, sendo que a legislação brasileira (BRASIL, 2008) permite um limite máximo de 20 mg de metanol por 100mL de álcool anidro. O metanol origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo normalmente presente nas frutas. Um aspecto relevante na produção de aguardente de frutas é o alto teor de metanol encontrado em algumas destas bebidas. Nestes destilados, este composto é resultante da hidrólise enzimática da pectina presente nas frutas pela pectina metilesterase (EC 3.1.1.11). A ingestão de um alto conteúdo de metanol pode provocar intoxicação aguda e morte. Uma vez metabolizado, o metanol é oxidado a pela enzima álcool desidrogenase a formaldeído, a seguir a oxidado a ácido fórmico pela enzima formaldeído desidrogenase e por fim, a dióxido de carbono por meio da enzima catalase, provocando acidose, alterando o sistema respiratório, podendo

levar a cegueira, convulsões e óbito (ALVARENGA, 2011; HANG et al., 2008; MOREIRA et al., 2012).

O carbamato de etila ou uretana é um composto considerado potencialmente carcinogênico. O Canadá foi o primeiro país que estabeleceu uma legislação específica para o carbamato de etila, e tornou-se referencia para os Estados Unidos e para a Comunidade Europeia, que também estabeleceram o limite de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ . A obrigatoriedade da detecção e controle do carbamato de etila na aguardente torna-se de grande importância, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, sua presença em concentrações superiores a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  constitui também uma barreira para exportações para Europa e América do Norte. Na tiquira destilada um pouco de cianeto residual pode permanecer. Não é suficiente para causar intoxicação, mas, pode dar origem ao carbamato de etila (MARELLI et al., 2013; MIRANDA et al. 2007; CEREDA et al., 2008).

O cobre é um dos metais indesejáveis na aguardente e seu limite permitido na legislação brasileira (BRASIL, 2005) é de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Sua presença na bebida provém do material tradicionalmente utilizado na construção dos alambiques. A legislação de alguns países do hemisfério norte estabelece um limite inferior a  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre nos destilados alcoólicos, dificultando a sua exportação para estes países (MARELLI et al., 2013; MIRANDA et al., 2007).

Os padrões estabelecidos com os seus respectivos limites na legislação brasileira tem a finalidade de proteger à saúde pública e melhorar o padrão de qualidade da bebida, não significando, portanto, que a aguardente que ali se enquadre possa ser considerada um produto de qualidade sensorial superior (MARELLI et al., 2013; MIRANDA et al., 2007).

## **2. Objetivo geral**

Esse estudo teve como objetivo a produção de aguardente de mandioca com aplicação de tecnologia de fermentação, utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* para liquefação e sacarificação do amido e utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação alcoólica.

## **2.1. Objetivos específicos**

- Realizar hidrólise enzimática do amido através da incubação da mandioca triturada com o fungo *Aspergillus oryzae* para obtenção do mosto de fermentação;
- Realizar fermentação alcoólica do mosto de mandioca hidrolisado com levedura comercial para obtenção do fermentado alcoólico;
- Realizar a destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de mandioca;
- Realizar as análises físico-químicas da aguardente de mandioca.

## **3. Justificativa**

Uma das razões para escolher a mandioca para produzir aguardente é o baixo custo, devido à grande produção no Brasil. A produção de álcool a partir de mandioca apresenta algumas dificuldades técnicas e econômicas. A necessidade de hidrólise do amido gera a elevação dos custos. O processo tradicional de fabricação da tiquira é artesanal, as cepas são colhidas ao acaso e não existe técnica de controle do processo, gerando desvantagens como baixo rendimento e produto final sem padrão de qualidade. Diante disso, os estudos de melhorias no processo tecnológico de produção são essenciais para viabilizar a utilização da mandioca como fonte de carboidratos para produção de aguardente.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Preparo da matéria-prima**

As raízes de mandioca foram obtidas na CEASA DF no período de Julho de 2014 e eram procedentes de produtores rurais do próprio DF. As raízes de mandioca foram adquiridas já lavadas e descascadas. No laboratório, as raízes foram trituradas em liquidificador e a massa obtida foi embalada e armazenada em freezer a -18°C até o momento de uso. Foram realizadas análises de umidade e pH (AOAC, 2006) da mandioca triturada.

#### **4.2. Liquefação e sacarificação do amido da mandioca**

Foram pesados 250 g de mandioca triturada em frascos erlenmeyers de 1000 ml e estes foram autoclavados por 15 minutos a 121°C. O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, adquirido na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais), foi inoculado sobre a mandioca.

O meio para produção do fungo *Aspergillus oryzae* foi constituído por 50 ml de Agar Sabouraud dextrose inclinado em frascos erlenmeyers de 250 ml. Após o crescimento do fungo, incubado a 24°C por 5-7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 ml de água destilada estéril, para obter uma solução de inóculo. Foram utilizados 10 ml dessa solução de inóculo para cada 250 g de mandioca triturada.

Para o crescimento do fungo sobre a mandioca, os erlenmeyers foram incubados a 24°C por 5-7 dias. Após o crescimento do fungo, foi adicionada a água destilada em cada erlenmeyer contendo a mandioca (proporção entre massa de mandioca e água de 1:1). A solução foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 45°C por 1 hora para intensificar a hidrólise enzimática do amido da mandioca, que assim se transformou no mosto a ser usado na etapa de fermentação alcoólica.

Foram realizadas análises físico-químicas no mosto. O grau Brix foi determinado por refratômetro de bancada e o pH foi determinado em pHmetro digital (AOAC, 2006). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

#### **4.3. Fermentação alcoólica**

O mosto de mandioca foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e na sequência foi fermentado com levedura *S. cerevisiae* comercial da marca FERMENTIS (FERMENTO S-04). Essa levedura comercial foi utilizada por sua característica de rápida fermentação e habilidade de formar uma sedimentação compacta no final da fermentação, ajudando a melhorar a limpidez do fermentado. A dosagem utilizada foi de 5,75 g de fermento seco para cada 9 litros de mosto.

Antes de inocular o fermento no mosto, procedeu-se a reidratação da levedura seca. Para isso misturou-se o levedo seco em um volume de 10 vezes seu

próprio peso com água destilada, por cerca de 30 minutos. Somente então, adicionou-se a levedura reidratada ao mosto de fermentação. A fermentação alcoólica foi realizada por 5-6 dias a 24°C. Concluída a etapa fermentativa, o meio fermentado foi filtrado para a separação do bagaço.

#### **4.4. Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de mandioca**

O pH foi determinado em pHmetro digital(AOAC, 2006).A acidez total foi determinada através da titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). A acidez volátil foi determinada através de arraste de vapor de água e posteriormente titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). O extrato seco foi determinado pela evaporação em estufa a 105°C até peso constante (IAL, 1985).

#### **4.5. Destilação do fermentado alcoólico de mandioca**

O líquido fermentado e filtrado foi destilado em um destilador de laboratório, com capacidade para 1 litro. O sistema de destilação era constituído de uma manta de aquecimento, um balão de 1 litro (contendo o líquido fermentado)conectado a uma coluna de Vigreux, ligada a um condensador de bolas por meio de uma cabeça de destilação Claysen (Figura 3).



**Figura 3: Foto do processo de destilação do fermentado alcoólico de mandioca**



A destilação teve a temperatura monitorada, sendo mantida entre 80 a 94°C. A primeira destilação prosseguiu sem separação de frações. Nesta primeira etapa o destilado se refere a todo o volume de álcool extraído do mosto fermentado e geralmente apresenta entre 27 e 32°GL. Este volume extraído foi armazenado em um recipiente, até que se tivesse volume suficiente para uma segunda destilação. O volume restante, sem a presença de álcool foi descartado.

Na segunda destilação foram separadas as frações de cabeça(10% do volume teórico inicial do destilado, grau alcoólico estimado de 70 a 50 % v/v), coração (80% do volume teórico do destilado, grau alcoólico estimado de 50 a 38 % v/v) e cauda(10% do volume teórico final do destilado, grau alcoólico estimado de 38 a 14 % v/v). As frações da aguardente foram armazenadas sob refrigeração em recipientes adequados e, posteriormente, foram feitas as análises físico-químicas.

#### **4.6. Análises físico-químicas da aguardente de mandioca**

O grau alcoólico foi determinado com uso de alcoômetro de Gay-Lussac colocado diretamente em volume de destilado a 20°C (IAL, 1985). A acidez total, fixa e volátil foi determinada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). As análises de furfural, metanol, aldeídos, ésteres e álcoois superiores foram determinadas por cromatografia gasosa (BORTOLETTO & ALCARDE, 2013). As frações cabeça e fração coração da aguardente de mandioca foram analisadas no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, Piracicaba, SP). A tabela 1 apresenta os valores estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2008) para a identidade e qualidade da tiquira.

**Tabela 1: Regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade da tiquira (BRASIL, 2008).**

| Variáveis  | Mínimo | Máximo |
|--|--------|--------|
| Álcool em °GL  | 36,0   | 54,0   |
| Acidez volátil em ácido acético em mg/100 ml de álcool anidro  | -      | 100    |
| Ésteres em acetato de etila em mg/100 ml de álcool anidro  | -      | 200    |
| Aldeídos em aldeído acético em mg/100 ml de álcool anidro  | -      | 20     |
| Metanol em mg/100 ml de álcool anidro  | -      | 20     |
| Álcoois superiores (isobutílico + isoamílicos + n-propílico)mg/100 ml  | -      | 300    |
| Cobre em mg/L  | -      | 5,0    |
| Furfural em mg/100 ml  | -      | 5,0    |
| Soma das impurezas totais "não álcool" (acidez volátil, ésteres, aldeído, furfural e álcoois superiores) em mg/100 ml de álcool anidro | 250    | 650    |

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Obtenção do mosto de fermentação através dahidrólise enzimática do amido da mandioca pelo fungo *Aspergillus oryzae*

No presente estudo, a mandioca triturada apresentou pH de 6,50 e o mosto de mandioca apresentou pH de 5,89 (Tabela 2). Esses resultados podem ser comparados ao trabalho de AUGUSTINI & EMILIO JUNIOR (2007), onde a massa de mandioca apresentou pH de 6,55 o mosto de mandioca apresentou pH de 5,14. Porém no trabalho de ARCE et al. (2005) o pH dos mostos de mandioca hidrolisados com enzimas comerciais tiveram uma variação menor de pH de 6,05 a 6,14.

Neste trabalho o mosto de mandioca apresentou valor médio de 13,03°Brix (Tabela 2), o que pode ser considerado um valor baixo para o processo fermentativo. Um conteúdo de açúcares em torno de 16% é considerado adequado para o processo fermentativo, muito acima disto a fermentação torna-se lenta e incompleta, enquanto que valores menores diminuem o rendimento do destilado e

facilitam a contaminação do mosto com bactérias produtoras de ácido acético (CANTÃO, 2006).

**Tabela 2: Análises físico-químicas da mandioca triturada e do mosto de mandioca.**

| <b>Variável</b>                                    | <b>Valor</b> |
|--|--------------|
| <b>Umidade da mandioca triturada (%)</b>           | 36,69 ± 1,35 |
| <b>pH da mandioca triturada</b>                    | 6,50 ± 0,01  |
| <b>pH do mosto de mandioca</b>                     | 5,89 ± 0,21  |
| <b>Grau Brix do mosto de mandioca (°Brix)</b>      | 13,03 ± 0,05 |
| <b>Açúcares redutores do mosto de mandioca (%)</b> | 6,80 ± 0,30  |

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de medidas em duplicata ou triplicata.

Neste trabalho, a mandioca triturada apresentou umidade de 36,69% (Tabela 2). No trabalho de ARCE et al. (2005) a massa ralada de mandioca apresentou umidade de 65,00%. No trabalho de AUGUSTINI & EMILIO JUNIOR (2007) a massa de mandioca apresentou umidade de 61,55%. O menor teor de umidade da mandioca deste trabalho provavelmente se deve ao congelamento da matéria prima antes do uso. Porém para o processo de hidrólise do amido de mandioca, essa umidade mostrou-se adequada para um bom desenvolvimento do fungo *Aspergillus oryzae* sobre a massa de mandioca (Figura 4).



**Figura 4: Foto da mandioca triturada após incubação com o fungo *Aspergillus oryzae* por 5-7 dias a 24°C.**

O método moderno de produção da tiquira sugerido por CEREDA (2008) é fazer a hidrólise do amido da mandioca com o uso de amilases comerciais. No trabalho de ARCE et al. (2005), o mosto de mandioca após ser hidrolisado com alfa amilase fúngica e amiloglicosidase comercial apresentou valor médio de 12,00°Brix.

Já o tratamento do mosto de mandioca com alfa amilase bacteriana termoresistente e amiloglicosidase comercial apresentou uma hidrólise bem mais eficiente, com valor médio de 20,50°Brix. O mosto de mandioca hidrolisado com alfa amilase fúngica apresentou 3,88% de açúcares redutores e 9,26% de dextrinas. Já o mosto de mandioca hidrolisado com alfa amilase bacteriana apresentou 7,48% de açúcares redutores e 14,00% de dextrinas. Neste trabalho, apesar do teor baixo de sólidos solúveis de 13,03°Brix foi obtido um valor satisfatório de açúcares redutores (6,80%), que são os açúcares fermentescíveis como glicose e maltose.

Segundo dados da literatura o fungo *Aspergillus oryzae* tem capacidade de produzir boas quantidades de alfa amilase e também produz amiloglicosidase, especialmente quando cultivado por FES (FRANCIS et al. 2002; GIGRAS et al., 2002; ISHIDA et al., 2000; ZAMBARE, 2010). A produção de alfa amilase por *A. oryzae* tem sido bastante estudada e o uso da mesma para produção comercial está

bem estabelecido (FRANCIS et al. 2002). No trabalho de ZAMBARE (2010) a produção de amiloglicosidase por *A. oryzae* por FES foi otimizada utilizando resíduos agroindustriais, obtendo-se resultados promissores para o uso dessa enzima na sacarificação de compostos amiláceos.

## 5.2. Fermentação alcoólica do mosto de mandioca

Foram obtidos 9 litros de mosto de mandioca a 13°Brix. Concluída a etapa fermentativa, o mosto fermentado filtrado rendeu um volume de 4,5 litros de fermentado alcoólico. A tabela 3 apresenta as análises físico-químicas do fermentado alcoólico de mandioca.

**Tabela 3: Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de mandioca**

| Variável               | Valor        |
|------------------------|--------------|
| pH                     | 5,33 ± 0,01  |
| Acidez total (meq/L)   | 9,67 ± 0,57  |
| Acidez volátil (meq/L) | 2,00 ± 0,01  |
| Extrato seco (g/L)     | 11,35 ± 0,28 |

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das medidas em duplicata ou triplicata.

Neste trabalho o mosto de mandioca apresentou pH de 5,89 e o fermentado apresentou pH de 5,33. No trabalho de AUGUSTINI & EMILIO JUNIOR (2007) o mosto de mandioca apresentou pH de 5,14e o fermentado apresentou pH de 4,38. A pequena variação de pH entre os mostos e a bebida fermentada se deve aos ácidos orgânicos formados como subprodutos da fermentação alcoólica pela levedura *Sacharomyces cerevisiae* (ASQUIERI et al., 2009).

O fermentado alcoólico de mandioca apresentou um baixo valor de acidez total (9,67 meq/L) e de acidez volátil (2,00 meq/L). O baixo valor de acidez mostra que o fermentado foi tecnologicamente bem elaborado. A acidez volátil encontra-se muito abaixo dos padrões estabelecidos pela legislação para vinhos de mesa, sendo o máximo permitido de 20 meq.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 1988).

### 5.3. Destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de mandioca

A primeira destilação prosseguiu sem separação de frações e o destilado apresentou teor alcoólico de 24°GL. Foram destilados 4,5 litros de fermentado alcoólico e obteve-se 400 ml de destilado (rendimento de 8,90%). Tal rendimento foi próximo do rendimento da tiquira produzida com enzimas comerciais (CEREDA, 2008). Na segunda destilação foram separadas as frações cabeça (10% do volume teórico inicial do destilado, ou seja, o volume inicial de 40 ml), coração e cauda. A fração coração rendeu volume de 120 ml e a cauda foi descartada.

Neste trabalho a fração coração apresentou teor alcoólico de 54°GL (Tabela 4). O teor alcoólico da aguardente de mandioca (54°GL) está no limite máximo da faixa estabelecida pela legislação brasileira para tiquira que é de 38 a 54°GL, (BRASIL, 2008). O alto teor alcoólico da aguardente de mandioca se deve ao processo de bidestilação, sendo possível uma diluição para a graduação característica deste tipo de bebida que é em torno de 40°GL. No trabalho de CLETO & MUTTON (2004) a porcentagem alcoólica das aguardentes de uva e laranja foi de 41,5 e 40,5%, respectivamente. A aguardente de jabuticaba apresentou teor alcoólico de 39,0°GL (ASQUIERI et al., 2009).

**Tabela 4: Análises físico-químicas do destilado de mandioca (fração coração)**

| <b>Variável</b>                                  | <b>Valor</b> |
|--|--------------|
| <b>Grau alcoólico (°GL)</b>                      | 54,00        |
| <b>Acidez total(mg ácido acético/100 ml)</b>     | 30,00        |
| <b>Acidez fixa(mg ácido acético/100 ml)</b>      | 6,00         |
| <b>Acidez volátil (mg ácido acético /100 ml)</b> | 24,00        |

A acidez volátil da aguardente de mandioca (24 mg/100 ml) ficou abaixo do permitido pela legislação brasileira para a tiquira que é de no máximo 100 mg/100 ml (BRASIL, 2008). Esse resultado pode ser comparado ao trabalho de ASQUIERI et al (2009), onde a aguardente de jabuticaba apresentou acidez volátil de 25 mg/100ml. O ácido acético é o componente secundário de maior responsabilidade pela acidez volátil da aguardente. A alta acidez volátil é indicativa de contaminação

microbiana advinda do processo ou de falha no recolhimento da fração (coração) ideal do destilado (ALVES, 2011;ASQUIERI et al., 2009).

A tabela 5 apresenta os resultados das análises cromatográficas das frações cabeça e coração da aguardente de mandioca, realizadas no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, Piracicaba, SP).

**Tabela 5: Análises cromatográficas do destilado de mandioca**

| <b>Variável</b>  | <b>Cabeça</b> | <b>Coração</b> | <b>Valores de referência</b> |
|--|---------------|----------------|------------------------------|
| Grau alcoólico real a 20°C (v/v)                         | 80,75         | 51,56          | 36-54                        |
| Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL álcool anidro) | 8,37          | 30,70          | 0-100                        |
| Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)     | 31,91         | 0,41           | 0-20                         |
| Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)     | 69,30         | 4,65           | 0-200                        |
| Álcool metílico (mg/100mL álcool anidro)                 | 99,88         | 127,15         | 0-20                         |
| Álcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)              | 1,19          | 0,37           | 0-10                         |
| Álcool propílico (mg/100mL álcool anidro)                | 224,82        | 172,46         | -                            |
| Álcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)             | 415,33        | 166,41         | -                            |
| Álcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)               | 3,73          | 2,58           | 0-3                          |
| Álcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)              | 260,69        | 123,62         | 0-300                        |
| Álcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)              | 900,84        | 462,49         | 0-300                        |
| Furfural (mg/100mL álcool anidro)                        | 0,00          | 0,00           | 0-5                          |
| Coeficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)       | 1010,43       | 498,25         | 250-650                      |
| Cobre (mg/L)   | 0,00          | 0,02           | 0-5                          |

Os valores de referência são estabelecidos pela legislação brasileira para a identidade e qualidade da tiquira (BRASIL, 2008).

Neste trabalho, tanto a fração cabeça (99,88 mg/100 ml) quanto a fração coração (127,15 mg/100 ml) da aguardente de mandioca apresentaram altos conteúdos de metanol, em níveis muito superiores ao permitido pela legislação brasileira que é de no máximo 20 mg/100ml. O metanol é um álcool indesejável na bebida devido a sua alta toxidez. Um alto teor de metanol nas bebidas destiladas origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo normalmente presente nas frutas (ALVARENGA, 2011). No trabalho de ALVES (2011) o destilado alcoólico de cajarana apresentou um teor de metanol de 62,1 mg/100 ml e o autor sugeriu que a alta concentração de metanol no destilado ocorreu devido a alta concentração de pectina na cajarana.

De acordo com FENIMAN (2004) a mandioca contém pectina (2,19-2,46% de pectina total determinada em massa úmida) e segundo alguns trabalhos da literatura o fungo *A. oryzae* é um bom produtor de enzimas pectinolíticas (AKBAR & PRASUNA, 2012; HOA & HUNG, 2013). Tais fatos sugerem que a degradação da pectina da mandioca com liberação de metanol no mosto de fermentação pode ter ocorrido durante o processo de sacarificação do amido, com a incubação de fungo *A. oryzae* sobre a mandioca triturada, ou seja, antes do processo de fermentação alcoólica.

Neste trabalho o mosto não foi filtrado antes da etapa de fermentação alcoólica. De acordo com VILELA (2005) a formação de metanol na produção de cachaça ocorre principalmente quando o caldo de cana não é filtrado e a fermentação ocorre na presença de quantidade considerável de bagacilho. CLETO (2000), ao estudar o efeito da lecitina em mosto de cana-de-açúcar, laranja e uva, constatou nas aguardentes produzidas, total ausência de metanol, o que atribuiu ao processo tecnológico empregado, qual seja: filtração, clarificação, centrifugação, que não permitiam a passagem de materiais que contivessem pectina para a etapa de fermentação alcoólica.

A cabeça é a fração do destilado formada, principalmente, por compostos voláteis de ponto de ebulição inferior ao álcool etílico. São componentes característicos da cabeça os aldeídos (aldeído acético), os ésteres (acetato de etila) e o metanol. Neste trabalho o processo de destilação foi adequado para separar o aldeído acético e o acetato de etila, que ficaram em maiores concentrações na



fração cabeça do destilado e em pequenas concentrações na fração coração do destilado.

O acetaldeído ou aldeído acético é o principal aldeído presente nas bebidas alcoólicas, representando cerca de 90% do total de aldeídos em bebidas não envelhecidas. O teor de aldeídos encontrado na fração coração da aguardente de mandioca foi de 0,41 mg/100 ml. O valor máximo permitido pela legislação brasileira é de 20 mg/100 ml (BRASIL, 2008). Na aguardente de jabuticaba foi encontrado um valor maior de aldeído acético de 13,60 mg/100 ml (ASQUIERI et al., 2009). Valores de aldeídos acima do permitido pela legislação brasileira foram encontrados nas aguardentes de uva e de laranja, 58,6 mg/100 ml e 86,2 mg/100 ml, respectivamente (CLETO & MUTTON, 2004). O aldeído acético é um composto que diminui a qualidade da cachaça e é tóxico quando ingerido em grande quantidade, sendo que sua concentração no destilado deve ser a menor possível (VILELA et al., 2007). O aldeído acético e outros aldeídos alifáticos de cadeia curta possuem sabor pungente e aromas penetrantes, geralmente enjoativos, sendo considerados indesejáveis em bebidas destiladas (ALCARDE et al., 2009).

O éster em maior quantidade na aguardente é o acetato de etila, representando aproximadamente 80% de todos os ésteres da aguardente. Foi encontrado um baixo teor de ésteres em acetato de etila (4,65 mg/100 ml) na fração coração da aguardente de mandioca. O valor máximo permitido pela legislação brasileira é de 200 mg/100 ml (BRASIL, 2008). Os ésteres podem ser detectados em concentrações muito baixas nas bebidas destiladas e somente comprometem o aroma das bebidas quando presentes em elevadas concentrações (ALVARENGA, 2011). Na aguardente de melão foi encontrado valor de acetato de etila de 4,08 a 15,4 mg/100 ml (HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2003) Na aguardente de jabuticaba foi encontrado um valor acima do permitido pela legislação brasileira, de 357 mg/100 ml. Concentrações elevadas de ésteres podem diminuir a qualidade do destilado, conferindo-lhe um sabor enjoativo e desagradável (LIMA et al., 2006).

Os teores de álcoois superiores (462,49 mg/100 ml) encontrados na aguardente de mandioca foram elevados, ficando acima do permitido pela legislação brasileira que é de 300 mg/100 ml (BRASIL, 2008). No trabalho de ALVARENGA (2011) os teores de álcoois superiores encontrados nas aguardentes de banana foram bastante elevados (610,70 a 891,00 mg/100 ml), ficando muito acima do

permitido pela legislação. No trabalho de VILELA (2005) o teor de álcoois superiores foi o parâmetro responsável pela maior porcentagem (36%) de reprovação das cachaças analisadas. De 25 amostras analisadas, nove apresentaram concentração total de álcoois superiores maiores que o limite da legislação.

Os álcoois superiores constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. Conferem corpo à bebida e esterificam-se durante o envelhecimento tornando a bebida mais agradável, o que aumenta o impacto sensorial. A formação de álcoois superiores tem uma forte influência no sabor das bebidas destiladas devido ao aroma característico. Os álcoois superiores, com três a cinco carbonos, apresentam odores característicos, tradicionalmente associados a bebidas destiladas. Acima de cinco carbonos, estes álcoois tornam-se oleosos, sendo que alguns deles lembram o aroma de flores (ALVARENGA, 2011; VILELA, 2005).

O líquido fermentado foi destilado em um destilador de laboratório, com capacidade para 1 litro, sendo assim, para destilar 4,5 litros de fermentado foram necessárias 6 etapas de destilação. A Tabela 6 apresenta as temperaturas dos processos de destilações, que variaram de 81°C a no máximo 90°C, com tempo de destilação de 30 minutos. A segunda destilação foi feita em uma única etapa, sendo que a temperatura da fração cabeça variou de 69-75°C e a temperatura da fração coração variou de 80- 90°C. O controle da temperatura no processo de destilação é importante, pois conduz a uma destilação mais lenta que resulta num destilado de baixa acidez e de melhor aroma, devido à riqueza em ésteres e álcoois superiores (LOPES, 2007). De acordo com OLIVEIRA (2001), a velocidade da destilação influencia nas características sensoriais de uma bebida alcoólica pela alteração nas quantidades de compostos voláteis absolutos e relativos resultantes e pelas reações químicas que ocorrem devido ao aquecimento. Segundo DANTAS et al.(2007), a destilação deve ser lenta para fazer a correta separação dos compostos, mas sem afetar demais o rendimento.

**Tabela 6: Temperatura das 6 etapas do processo da primeira destilação do fermentado alcoólico de mandioca**

| <b>Primeira Destilação</b> | <b>Tempo (minutos)</b> | <b>Temperatura (°C)</b> |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Etapa 1</b>             | 7,5                    | 81                      |
|                            | 15,0                   | 90                      |
|                            | 22,5                   | 90                      |
|                            | 30,0                   | 90                      |
| <b>Etapa 2</b>             | 7,5                    | 82                      |
|                            | 15,0                   | 85                      |
|                            | 22,5                   | 87                      |
|                            | 30,0                   | 88                      |
| <b>Etapa 3</b>             | 7,5                    | 89                      |
|                            | 15,0                   | 88                      |
|                            | 22,5                   | 90                      |
|                            | 30,0                   | 87                      |
| <b>Etapa 4</b>             | 7,5                    | 89                      |
|                            | 15,0                   | 88                      |
|                            | 22,5                   | 90                      |
|                            | 30,0                   | 87                      |
| <b>Etapa 5</b>             | 7,5                    | 88                      |
|                            | 15,0                   | 89                      |
|                            | 22,5                   | 85                      |
|                            | 30,0                   | 90                      |
| <b>Etapa 6</b>             | 7,5                    | 89                      |
|                            | 15,0                   | 89                      |
|                            | 22,5                   | 88                      |
|                            | 30,0                   | 90                      |

## **6. Conclusão**

O mercado da mandioca encontra-se em expansão, sendo bastante importante em determinados países da África, países asiáticos e no Brasil, em quase toda sua extensão. Considerada uma cultura rústica, a espécie apresenta poucas exigências para seu cultivo e mostra alto potencial para produção de derivados. No Maranhão, a tiquira é uma bebida regional popular, porém vem perdendo mercado pelo seu custo e tempo de produção, carecendo de técnicas e

parâmetros técnicos para seu processamento, de forma que possa concorrer com as bebidas derivadas da cana de açúcar.

Outra técnica que poderia ser testada para a produção da aguardente de mandioca é o processo de fermentação paralela usado na produção do saquê. Na produção de saquê, após o cozimento do arroz, este é separado em duas partes, uma vai direto para a fermentação e com a outra parte é feita o *koji*. O *koji* é a pasta de arroz cozido onde o fungo *Aspergillus oryzae* foi cultivado. Para o processo de produção de saquê, por batelada, adicionam-se partes do koji e partes do fermento (levedura alcoólica) em tanques de fermentação contendo a pasta de arroz cozido. Durante a fermentação, o *koji* quebra continuamente o amido do arroz em açúcares, enquanto a levedura converte-os em álcool. Esta etapa é denominada fermentação paralela ou múltipla e é uma das etapas mais notáveis no processo de produção de saquê. A fermentação deve continuar por aproximadamente 25 dias e o teor alcoólico do saquê é de aproximadamente 20% (MIGUEL, 2011).

Neste trabalho, a produção de uma aguardente a partir da mandioca mostrou-se possível, em escala de laboratorial. Porém a hidrólise enzimática do amido da mandioca precisa ser melhorada para produzir um maior teor de açúcares fermentescíveis e assim aumentar o teor alcoólico do fermentado e o rendimento do destilado. Outro parâmetro que precisa ser controlado é o conteúdo de metanol na fração coração do destilado. Sendo assim, existe a necessidade de modificação da metodologia, a fim de se obter uma aguardente com baixo conteúdo de metanol que se enquadre nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira.

## 7. Referências bibliográficas

ABE K.; GOMI K.; HASEGAWA F.; MACHIDA M.; **Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites**, *Mycopathologia*, v. 162, p.143–153, 2006.

ABDULLAH, R.; HAQ; I. U.; JAVID, M. **Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by wild and mutant strain of *Aspergillus oryzae* in stirred fermenter**, *Pakistan Journal of Botany*, v. 43, n.1, p. 715-723, 2011.

ADEJUMO, A. L.; ADERIBIGBE, A. F.; LAYOKUN, S. K.; Cassava starch: production, physicochemical properties and hydrolysis - A review. **Advances in Food and Energy Security**, v. 2, p. 8-17, 2011.

AGUSTINI, D; EMILIO JUNIOR, H. Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural. **Synergismus Scientifica**, Pato Branco, v. 2, p. 1-4, 2007.

AKBAR, S.; PRASUNA, R. G. Exploitation of fruit wastes for pectinase production using *Aspergillus oryzae*, **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.3, n. 3, p. (B) 756 – 765, 2012.

ALCARDE, R. A.; SOUZA, P. A.; BOSQUEIRO, A. C.; BELLUCO, A. E. S. Cinética de volatilização de componentes secundários da aguardente de cana-de-açúcar durante dupla destilação em alambique simples. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 271-278, 2010.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BOSQUEIRO, A. C.; BELLUCO, A. E. S. Perfil físico-químico de aguardente de cana-de-açúcar produzida por metodologias de dupla destilação em alambique simples, **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.3, p. 499-503, 2009.

ALVARENGA, R. M. **Avaliação de parâmetros da fermentação e da destilação para adequação dos teores de compostos secundários em aguardente de banana**, Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, 155 p., 2011.

ALVES, H. O. **Obtenção e análise físico-química do destilado alcoólico da cajarana (*Spondiassp*) no semiárido paraibano**, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, 74 p., 2011.

AOAC - Official methods of analysis, Washington, 18 ed., 2006.

AQUARONE, E.; LIMA U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 243 p., 1986.

ARCE, L. S. D.; PASCOLI, M. C.; VILPOUX, O. **Tiquira produzida com enzimas comerciais**. CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2005, Campo Grande, MS. Ciência e tecnologia para a raiz do Brasil: anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.

ASQUIERI, E. R., SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 896-904, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 65, DE 23 DE ABRIL DE 2008. Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas destiladas: aguardente de melaço, aguardente de cereal, aguardente de vegetal, aguardente de rapadura, aguardente de melado, aguardente de fruta, arac, rum, sochu, tequila, **tiquira** e uísque. Brasília, DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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, Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho, Brasília, DF, 1988.

BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão, **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **ScientiaAgrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **FoodChemistry**, Reading, v.139, p.695-701, 2013.

CAMPOS L. M. A. S. **Estudo dos parâmetros fermentativos na obtenção de aguardente de mel**, Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.

CANCELIER, A. et al. Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destilada de uva-japão (*Hoveni aduclis Thunberg*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p. 59-67, 2013.

CANTÃO, F. O. **Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por alumínio silicatos**. Dissertação (Mestrado). UFLA, 2006.

CENI, G. C.; COLET R.; PERUZZOLO, M.; WITSCHINSKI F.; TOMICKI L.; BARRIQUELLO, A. L.; VALDUGA E. Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.1, p. 107-111, 2009.

CEREDA M. P.; CARNEIRO M. S. C.; Manual de Fabricação de Tiquira (Aguardente de Mandioca), por Processo Tradicional e Moderno: Tecnologias e Custos de Produção, Embrapa , 2008.

CEREDA, M.P. Tiquira e outras bebidas de mandioca. In: VENTURINI FILHO, W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, cap.21, p.525-550, 2005.

CHANCHAROONPONG C.; HSIEH P.; SHEUB S.; Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation, **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 4, p. 228-231, 2012.

CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Rendimento e composição das aguardentes de cana, laranja e uva com utilização de lecitina no processo fermentativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 577-584, 2004.

CLETO, V. G. **Ação da lecitina no processo fermentativo, rendimento e composição das aguardentes em mosto de cana de açúcar, laranja e uva**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 73p., 2000.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando à obtenção de etanol**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Alagoas, 109 p., 2010.

DANTAS, H. J.; VILAR, F. A.; SILVA, F. L. H.; SILVA, A. S. Avaliação da influência da velocidade de destilação na análise físico-química de aguardente de cana-de-açúcar, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.9, n.2, p.101-109, 2007.

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, A.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p.190-197, 2006.

FENIMAN, C. M. **Caracterização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar IAC 576-60 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita**, Tese (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos), ESALQ, USP, Piracicaba, SP, 82 p., 2004.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 320–326, 2002.



GIGRAS, P.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and production of ITS-amylose from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor, **Current Microbiology**, v. 45, p. 203–208, 2002.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Methanol content of grappa made from New York grape pomace, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3923–3925, 2008.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ, L. F.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods. **Food Chemistry**, v. 82, p. 539-543, 2003.

HOA, B. T.; HUNG, P. V. Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology, **International Food Research Journal**, v. 20, n.6, p. 3269-3274, 2013.

ISHIDA, H.; HATA, Y.; KAWATO, A.; ABE, Y.; SUGINAMI, K.; IMAYASU, S. Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (glaB) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*, **Current Genetics**, v. 37, p. 373-379, 2000.

JANZANTTI, N. S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça**. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos), 179 p., 2004.

LIMA, A. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, v. 29, p. 247-250, 2006.

LOPES, R. L. T., Dossiê técnico - **Processamento de Cachaça de Alambique**, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC, 29 p., 2007.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. **Oxford Journals**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MATTOS P. L. P.; CARDOSO E. M. R. **Cultivo da Mandioca para o Estado do Pará: Importância Econômica**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistemas de Produção; 2003. Disponível em: [http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_para/importancia.htm](http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_para/importancia.htm). Acessado em: 18 de setembro de 2014.

MARELLI L. S.; ALCARDE A. R.; LIMA F. V.; BOTOLETTO A. M. **Produção de Cachaça de Qualidade**, Universidade de São Paulo, Ed. da ESALQ, Piracicaba, 72 p., 2013.

MIGUEL, D. **Produção de saquê**, Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, 2011.

MIRANDA M. B.; MARTINS N. G. S.; BELLUCO A. E. S.; HORII J.; ALCARDE A. R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 897-901, 2007.

MOREIRA R. F. A.; NETTO C. C.; E MARIA C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil, **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.

NETO, C. R.; MARCOLAN, A. L. **Estudo exploratório acerca do comportamento de consumo de mandioca e derivados no Brasil, com ênfase na Região Norte**. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Campo Grande, MS, 2010.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.

OLIVEIRA D. C. **Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (*Manihotesculenta* Crantz).** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 142 p., 2011.

OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais,** Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 135 p., 2001.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology.** 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PEIXOTO, S. C. et al. *Rhizopus microspores var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 269-273, 2003.

RIBEIRO, D. M. L. **Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (Tiquira),** Tese de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, 78 p., 2011.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Sistema de Produção de Destilado de Vinho.** EMBRAPA UVA E VINHO, 2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoDestiladoVinho/destilacao.htm>, Acessado em: 05 de outubro de 2014.

ROTA, M. B.; FARIA, J. B. Efeito do processo de bidestilação na qualidade sensorial da cachaça, **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p. 121-127, 2009.

SANT'ANA, A. F.; DOMENE, S. M. A. Teores de glicosídeos cianogênicos em derivados de mandioca determinados por protocolo adaptado ao laboratório de micronutrientes – Anais do XIII Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas – 2008.

U. S. Environmental Protection Agency, ***Aspergillus oryzae* Final Risk Assessment; Attachment I - Final risk assessment of *Aspergillus oryzae***, Disponível em: <[http://www.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra007.htm](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra007.htm)>. Acessado em: 18 de setembro de 2014.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. do P. **Fermentação alcoólica de raízes tropicais**. In: CEREDA, M. P; VILPOUX, O. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosasamiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, p.530-575. 2003.

VILELA, F. J. et al. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, 2007.

VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique**, Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, 95 p., 2005.

ZAMBARE V. Solid state fermentation of *Aspergillusoryzae* for glucoamylase production on agro residues, **International Journal of Life Sciences**, v. 4, p. 16-25, 2010.

## Anexo 1: Laudo das análises da aguardente de mandioca



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"



DEPARTAMENTO DE AGROINDÚSTRIA, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO Av. Pádua Dias, 11 • Cep 13418-900 • Piracicaba, SP • Brasil  
Fone (19) 3429 4110 • Fax (19) 3422 1733 www.esalq.usp.br

### CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 01-10/14 - Amostra de aguardente de mandioca

|  | Cabeça  | Coração | Referência (IN 13) |
|--|---------|---------|--------------------|
| Grau alcoólico real a 20°C (v/v)                         | 80,75   | 51,56   | 38-54              |
| Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL álcool anidro) | 8,37    | 30,70   | 0-150              |
| Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)     | 31,91   | 0,41    | 0-30               |
| Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)     | 69,30   | 4,65    | 0-200              |
| Álcool metílico (mg/100mL álcool anidro)                 | 99,88   | 127,15  | 0-400              |
| Álcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)              | 1,19    | 0,37    | 0-10               |
| Álcool propílico (mg/100mL álcool anidro)                | 224,82  | 172,46  | -                  |
| Álcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)             | 415,33  | 166,41  | -                  |
| Álcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)               | 3,73    | 2,58    | 0-3                |
| Álcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)              | 260,69  | 123,62  | -                  |
| Álcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)              | 900,84  | 462,49  | 0-360              |
| Furfural (mg/100mL álcool anidro)                        | 0,00    | 0,00    | 0-5                |
| Coefficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)      | 1010,43 | 498,25  | 200-650            |
| Cobre (mg/L)   | 0,00    | 0,02    | 0-5                |

OBSERVAÇÕES: A presente análise tem valor restrito à amostra recebida no laboratório. A identificação da amostra é de exclusiva responsabilidade do remetente. Laudo com resultados exclusivamente destinados para a finalidade de pesquisa científica acadêmica.

#### METODOLOGIAS UTILIZADAS:

ALCARDE, A.R.; SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, v.118, n.1, p.27-31, 2012.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, Reading, v.139, p.695-701, 2013.

Piracicaba, 10 de outubro de 2014.

Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas

Prof. Dr. André Ricardo Alcarde (CREA: 5060223704)