

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA- PPGQuim

FRANCISCO ALBUQUERQUE BASTOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TIQUIRA EMPREGANDO
ENZIMAS COMERCIAIS E FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DOS BEIJUS
UTILIZADOS NO MÉTODO TRADICIONAL**

SÃO LUIS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TIQUIRA EMPREGANDO
ENZIMAS COMERCIAIS E FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DOS BEIJUS
UTILIZADOS NO MÉTODO TRADICIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Maranhão
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profº Dr. Hildo Antonio Santos Silva

SÃO LUIS
2013

Bastos, Francisco Albuquerque.

Otimização do processo de produção de tiquira empregando enzimas comerciais e fungos isolados a partir dos beijos utilizados no método tradicional/ francisco Albuquerque Bastos. São Luis, 2013

74 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Hildo Antonio S.Silva.

FRANCISCO ALBUQUERQUE BASTOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TIQUIRA EMPREGANDO
ENZIMAS COMERCIAIS E FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DOS BEIJUS
UTILIZADOS NO MÉTODO TRADICIONAL**

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Hildo Antonio Santos Silva
(Orientador)
Departamento de Química - UFMA

Examinador 1

Examinador 2

AGRADECIMENTOS

A Deus, todo poderoso, criador do céu e da terra. Ao Senhor Jesus Cristo, filho de Deus pai, salvador do mundo. A Nossa Senhora, mãe de Jesus, virgem Maria. Santa Madre Paulina, minha mãe brasileira, por sempre me protegerem nos momentos mais delicados e angustiantes;

Ao meu pai Sebastião Guimarães Bastos e minha mãe Maria José Albuquerque Bastos;

A minha esposa, Amparo e meus filhos, Filipe e Fernanda, pelo amor, companheirismo e compreensão desde o princípio, para realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Hildo Antonio Silva Santos pela oportunidade, confiança e dedicação durante toda esta caminhada;

Aos novos colegas conquistados no decorrer do curso de mestrado: professores, servidores e alunos, pela cooperação;

Ao amigo Marinaldo, pelo incentivo e auxílio durante a realização dos experimentos no laboratório do UNICEUMA;

Aos colegas professores Silvio Coêlho e Diogo Ribeiro pela grande ajuda e disposição em me ajudar com toda suas experiências;

À LNF Latino Americana, representada pelo Engenheiro de Alimentos Eduardo Bihre, pelo fornecimento das enzimas;

Aos colegas do LDQA-USP/São Carlos –SP: Filipe, Thiago e Silmara.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A tiquira é uma bebida típica do Maranhão (Brasil), obtida a partir de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz.), sua produção se concentra em diversos municípios do Estado, através de um processo artesanal, bastante primitivo, no qual a conversão do amido de mandioca em açúcares fermentescíveis é feita por bolores nativos que surgem sobre os beijus de massa de mandioca, onde as cepas são colhidas ao acaso. A fermentação alcoólica também é feita por leveduras selvagens. Tem sua comercialização praticada de modo informal, dificultando o registro de dados estatísticos de produção e número de produtor no Ministério da Agricultura. Com o objetivo de otimizar o referido processo, utilizaram-se, enzimas comerciais, cepas de fungos (*Aspergillus niger*), para a conversão do amido em mosto fermentescíveis e leveduras prensadas para fermentação. Os processos aqui propostos seguiram três etapas: gelificação do amido com a posterior dextrinização e sacarificação a açúcares, fermentação alcoólica e destilação do vinho fermentado. Substituindo-se os bolores por enzimas comerciais nas circunstâncias propostas, a fabricação da tiquira foi realizada em apenas 25 horas, enquanto que ao utilizar fungos isolados, a produção do aguardente demorou, aproximadamente, 136 horas para o seu processamento. Evidenciou-se assim, uma considerável redução de tempo, nos dois processos aqui apresentados em relação ao processo tradicional, que demora, aproximadamente, 20 dias para a consecução do destilado. Verificou-se também que os processos de fermentação e destilação do mosto oriundos da sacarificação da massa de mandioca são equivalentes ao da cana-de-açúcar, podendo ser processados com os mesmos equipamentos, por pequenos produtores de tiquira. Comprovou-se que as concentrações de cobre e carbamato de etila foram visivelmente reduzidas nos processos propostos em relação ao processo tradicional, possibilitando uma melhor qualidade da bebida, assim como reduzindo os riscos à saúde dos consumidores. A partir dos experimentos realizados conclui-se que a substituição do processo tradicional por enzimas comerciais, fungos isolados e levedura prensada se mostra tecnicamente possível e recomendada, primordialmente, aos pequenos produtores.

Palavras-chave: Amido; Enzimas Comerciais; Fungos Isolados; Tiquira.

ABSTRACT

Tiquira, a strong content beverage from Maranhão (Brazil), obtained from cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) has its production concentrated in several counties of the State, through a handmade process , rather primitive, in which the conversion of starch cassava is taken into fermentable sugars by fungi which is found on the native beijos of manioc where strains are picked at random. Alcoholic fermentation is also made by yeasts found in the environment. Its commercialization is practiced informally, making it difficult to record statistical data of production and the number of producers in the Ministry of Agriculture. In order to optimize this process, commercial enzymes, strains of fungi (*Aspergillus niger*), were used to in order to convert starch into fermentable wort and pressed yeasts for fermentation. The processes proposed here follow three steps: gelation of starch scarification and subsequent dextrinization the sugars, alcoholic fermentation and distillation of fermented wine. Substituting the mold for commercial enzymes in the proposed circumstances, the manufacturing of tiquira was performed in just 25 hours, whereas when using fungi isolated, the production of tiquira took approximately 136 hours for its processing. As one can see, there was a considerable reduction of time in the two cases presented here in relation to the traditional process, which takes approximately 20 days to achieve the distillate. It was also found that the fermentation and destillation of the wort resulting from the scarification of cassava is equivalent to that of cane sugar, and both processes can be processed with the same equipment by tiquira producers. It was shown that the concentrations of copper and ethyl carbamate were visibly reduced in comparison to the traditional process, enabling a better quality of the beverage, as well as reducing the risks to consumer health. From the experiments it can be concluded that the replacement of the traditional process by commercial enzymes, fungi isolated and pressed yeast are highly and technically recommended primarily to small producers.

Keywords: Starch; Commercial Enzymes, Fungi Isolated; tiquira.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x	
LISTA DE FIGURAS	xi	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii	
1	INTRODUÇÃO	13
2	MATÉRIA-PRIMA.....	17
2.1	Mandioca	17
2.2	Amido	18
2.2.1	Estrutura do amido	19
2.2.2	Gelificação do amido	21
2.2.3	Sacarificação do amido de mandioca	22
2.3	Enzimas	24
2.3.1	Enzimas amilolíticas	25
2.4	Fungos.....	27
2.4.1	Fungos filamentosos.....	28
2.4.1.1	<i>Fungos do gênero Aspergillus</i>	<i>29</i>
2.4.1.2	<i>Fungos do gênero Rhizopus.....</i>	<i>30</i>
2.4.1.3	Fatores que influenciam no crescimento dos fungos.....	30
3	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	31
3.1	Leveduras alcoólicas	32
3.1.1	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.1.2	Levedura selvagem	34
4	DESTILAÇÃO	34
5	PROCESSAMENTO DA TIQUIRA PELO MÉTODO TRADICIONAL	36
5.1	Principais operações unitárias.....	36
6	PROCESSAMENTO DA TIQUIRA PELOS MÉTODOS PROPOSTOS	40
7	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
7.1	Materiais	42
7.1.1	Mandioca	43
7.1.2	Enzimas comerciais.....	43
7.1.3	Fungos isolados.....	44
7.1.4	Agente de fermentação alcoólica	44
8	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TIQUIRA	

	EMPREGANDO ENZIMAS COMERCIAIS E FUNGOS ISOLADOS	45
8.1	Produção de tiquira empregando enzimas comerciais	45
8.1.1	Gelificação/liquefação do amido da massa de mandioca	45
8.1.2	Sacarificação do amido da massa de mandioca	45
8.1.3	Fermentação alcoólica.....	46
8.1.4	Destilação	47
8.2	Produção de tiquira empregando fungos isolados	47
8.2.1	Gelificação/liquefação do amido da massa de mandioca	47
8.2.2	Sacarificação do amido da massa de mandioca	48
8.2.3	Fermentação alcoólica.....	48
8.2.4	Destilação	49
8.3	Análises físico-químicas das tiquiras	49
8.3.1	Açúcares redutores.....	50
8.3.2	Cobre.....	51
8.3.3	Carbamato de etila	52
8.3.4	Álcoois superiores, 1-butílico, 2-butílico, lactato de etila e metanol.....	53
8.3.5	Teor alcoólico, acidez volátil e éster	54
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
9.1	Gelificação/liquefação e sacarificação	56
9.2	Fermentação alcoólica	58
9.3	Destilados	58
9.4	Caracterização das tiquiras	59
10	CONCLUSÕES	64
11	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
12	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	67
	ANEXO 1.....	74
	ANEXO 2.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos processos de sacarificação e fermentação	60
Tabela 2: Sólidos solúveis nos processos após sacarificação dos mostos	60
Tabela 3: Caracterização da tiquiras produzidas com enzimas comerciais, fungos isolados e pelo método tradicional.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	18
FIGURA 2: Estrutura química da molécula de amilose	20
FIGURA 3: Estrutura química da molécula de amilopectina.....	21
FIGURA 4: Ação das Enzimas Amilolíticas sobre uma molécula de amido. As flechas indicam os pontos em que as ligações são rompidas	26
FIGURA 5: Conversão da glicose a etanol e dióxido de carbono	33
FIGURA 6: Principais operações unitárias	36
FIGURA 7: Ralador de mandioca (catitu).....	37
FIGURA 8: Prensa manual (A), água de manipueira (B) e peneira de palha (C)....	38
FIGURA 9: Beiju sendo assado (A) e embolorando do beiju no jirau (B)	39
FIGURA 10: Dorna de fermentação (A) e Alambique de cobre(B)	40
FIGURA 11: Fluxograma dos processos de produção de tiquira.....	44
FIGURA 12: Etapa de conversão do amido utilizando α -amilase (A) e Glucoamilase (B)	46
FIGURA 13: Dorna de fermentação (A) e reação de fermentação (B)	46
FIGURA 14: Separação de resíduos sólidos após fermentação (A), destilação de aguardente obtida a partir de amido de mandioca (B) e resíduos após destilação (C)	47
FIGURA 15: Etapa de gelificação e liquefação (A) e sacarificação (B) do amido com solução de esporos de <i>Aspergillus niger</i>	48
FIGURA 16: Reação de Fermentação.....	49
FIGURA 17: Ataque das enzimas amilase e amiloglicosidase.....	57
FIGURA 18: Eficiência dos processos de produção de tiquira	59
FIGURA 19: Concentração de cobre nas tiquiras	63
FIGURA 20: Concentração de carbamato de etila nas tiquiras	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°GL	Grau Gay-Lussac
g	Gramas
ml	Mililitro
Mg	Miligrama
L	Litro
V	Volume
α	Alfa
β	Beta
pH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
S.	<i>Saccharomyces</i>
H	Horas
%	Percentual
R.	<i>Rhizopus</i>
A.	<i>Aspergillus</i>
μ l	Microlitro
ART	Açúcares Redutores Totais
AR	Açúcar Redutor
°Bx	Graus Brix

1 INTRODUÇÃO

As aguardentes são produzidas no Brasil através de processos industriais ou artesanais. O produto obtido industrialmente é processado por grandes empresas e apresenta padronização da qualidade, enquanto, o produto artesanal é elaborado em pequena escala de modo tradicional sem muito controle do processo, onde, geralmente a fermentação alcoólica é realizada por leveduras selvagens adquiridas do meio e a destilação acontece em alambiques de cobre, o que resulta em um produto final de qualidade variável.

O Brasil vem se destacando na fabricação de cachaça com uma produção que atinge dois bilhões de litros, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida do país e a primeira entre as bebidas destiladas nacionais.¹ Outra aguardente brasileira é a tradicional tiquira, que é elaborada por um processo bastante rudimentar¹⁻³.

O aumento do consumo de aguardente e a possibilidade de exportação exigem que o processo de fabricação seja baseado em práticas criteriosamente determinadas, para a obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais.

Os destilados de uma maneira geral são designados como aguardentes, os quais se distinguem pela natureza da matéria-prima empregada na preparação do mosto.

As aguardentes no Brasil estão definidas e regulamentadas pelo Decreto Federal do Ministério da Agricultura e Abastecimento nº 2314, de 4 de setembro de 1997, que regulamenta a padronização e a fiscalização da produção de bebidas.⁴

Entre as aguardentes brasileiras, existe a tiquira que é uma bebida derivada da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz), tem legislação específica, conforme Portaria nº 65, de 23 de abril de 2008.⁵ Assim como outras é calórica, principalmente em razão do seu teor alcoólico. É típica do estado do Maranhão, onde existem diversos municípios que a produzem, sendo ela bastante apreciada localmente. Atualmente, o Maranhão figura como único Estado brasileiro produtor dessa bebida.

A tiquira é produzida por pequenos produtores através de um processo artesanal, bastante rudimentar, hereditário e que ainda conserva algumas crendices. Tem sua comercialização praticada de modo informal, o que impossibilita o registro de dados estatísticos de produção e número de produtor no Ministério da

Agricultura.¹⁻³

O processo é realizado em precárias condições de higiene e de infraestrutura dos locais de trabalho, o qual demora aproximadamente vinte dias para a obtenção do destilado, tornando o produto sem padronização e consequentemente deixando a bebida sem condição de competir com outras aguardentes.^{2,3}

Neste processo tradicional, a conversão do amido de mandioca em açúcares fermentescíveis é feita por bolores nativos que surgem sobre os beijus. As cepas são colhidas ao acaso, a partir do meio. A fermentação alcoólica também é feita por leveduras selvagens. Esse tipo de processamento é extremamente lento e de baixo rendimento.¹⁻³

A tiquira se distingue também das outras aguardentes pela coloração levemente azulada obtida através da adição de folhas de tangerina ao processo de destilação, o que representa uma forma de apresentação e um atrativo a mais para o consumo. O constituinte fotossensível por esta coloração é volátil e, com o tempo, a bebida torna-se incolor.³ No entanto, com o objetivo de obter uma coloração permanente, os produtores, atravessadores e comerciantes acrescentam uma substância de tonalidade violeta, bastante forte, cuja natureza química já foi identificada e quantificada, trata-se do corante violeta genciana (cloreto de hexametilpararosanilina), que é um produto industrializado não alimentício, é de uma espécie química bastante reativa no organismo, com indicações de ser mutagênica, podendo provocar ulcerações no organismo.⁶ Diante desta realidade, vislumbra a importância de estabelecermos corantes alimentícios adequados, em substituição do composto cristal violeta, sem riscos ao consumidor e sem alterar a qualidade sensorial e visual da tiquira.

Dentro do cenário brasileiro referente as aguardentes, de acordo com estudos realizados²⁻³, a tiquira é a que apresenta maior número de problemas relativos à sua composição. Vários trabalhos^{7,8} demonstraram que essa bebida contém, em média, um teor de cobre mais elevado do que outros destilados, é bastante rica em íons cianetos, os quais, juntamente com íons cobre, podem ser precursores de carbamato de etila.⁹⁻¹¹

Os padrões de identidade e qualidade com os respectivos limites que a tiquira deve atender são estabelecidos pela Legislação Nacional vigente⁵, que além de especificar valores, têm a finalidade de moderar a influência de cada um desses

componentes na proteção à saúde pública e no padrão de qualidade da bebida.

A sacarificação do amido de mandioca pode ser feita por hidrólise química ou enzimática liberando assim, açúcares fermentescíveis. A hidrólise ácida é eficiente e relativamente barata, porém gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Já a via enzimática pode ser conseguida com o uso de enzimas amilolíticas, obtidas através de vários agentes enzimáticos, tais como: o malte, farelo enzimático, enzimas comerciais purificadas e utilizando-se batata-doce. Esse procedimento é sem dúvida a forma mais eficiente de conversão do amido.^{2,3}

Outra forma enzimática para a conversão do amido de mandioca é o emprego de cultura de bolores que possuem as enzimas sacarificantes que são capazes de transformar o amido em açúcares, cujo crescimento se dá sobre farelos de milho, trigo, arroz, cevada e massa de mandioca, previamente gelificados. O farelo enzimático, além de ser facilmente produzido, apresenta geralmente alto rendimento em glicose.¹²⁻¹⁴

As raízes da mandioca apresentam alto teor de carboidratos, na forma de amido, que pode ser convertido em açúcares e serem fermentados para a produção de bebidas alcoólicas e etanol. No processamento da tiquira pelo método tradicional, geralmente a raiz da mandioca é descascada, ralada e prensada para formar os beijos, que são espalhados e assados sobre uma chapa aquecida a lenha, para se conseguir a gelificação do amido. A gelificação do amido tanto no processo tradicional ou em outro modernizado, facilitará a ação das enzimas.¹⁻³

O amido não é fermentado pelas leveduras, devido sua estrutura ser muito complexa, com um número muito grande de ligações entre moléculas de glicose e por não possuir enzimas amilolíticas.¹⁻³ No processo de fermentação, as leveduras desdobram a glicose em álcool etílico e gás carbonico. A levedura empregada na fermentação depende de várias situações, entre as quais a matéria-prima utilizada, o teor alcoólico desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, dentre outros. A *Saccharomyces cerevisiae* Hansen é utilizada principalmente na produção de álcool comum, aguardentes, cerveja e outras bebidas e também na panificação.^{15,16}

O processo de destilação das aguardentes geralmente é realizado em alambiques simples, principalmente confeccionado em cobre. A primeira fração destilada é chamada de *cabeça* e corresponde a cerca de 10% do destilado, possui maior proporção de compostos mais voláteis, deve ser separada da parte nobre da

destilação chamada *coração* ou *restilo* que corresponde a 80% do volume do destilado, onde está concentrado o etanol, ésteres e demais substâncias que dão qualidades a bebida. A *cauda* ou *surrapa*, que corresponde aos 10% restantes do destilado, é também denominada de água fraca e contém elementos menos voláteis e compostos indesejáveis. A *cabeça* e a *cauda* devem ser desprezadas.^{15,16} Usa-se um alcoômetro para estabelecer o teor alcoólico final do processo de destilação.

Para a produção da tiquira com fungos isolados neste trabalho de pesquisa adotou-se como referencial, o estudo de identificação e seleção dos melhores micro-organismos sacarificantes e fermentativos empregados no processo artesanal.¹⁷ As cepas selecionadas utilizadas para a conversão do amido em açúcares fermentáveis foram as de *Aspergillus niger*, as quais foram testadas perante o seu poder de sacarificação de amido em massa de mandioca.

A composição química da cachaça e outras aguardentes vêm sendo estudada de forma sistemática há bastante tempo. Neste contexto, destaca-se o Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente (LDQA), pertencente ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), que vem propondo novas metodologias analíticas para aplicações rotineiras de análise química de aguardente de cana, tiquira e outras bebidas destiladas. Pela baixa competitividade que a tiquira apresenta, propõe-se a modernização deste padrão, aplicando técnicas adequadas, contudo, de forma simples e sem prejuízo das características da bebida e oferecendo novas tecnologias aos pequenos produtores.¹⁻³

Em virtude da escassez de metodologias adequadas referente à produção da tradicional tiquira e levando-se em consideração a busca por produtos que conciliem qualidade com sustentabilidade no que tange ao meio ambiente, o presente trabalho tem por objetivo principal apresentar o aperfeiçoamento do processo de fabricação da tiquira, avaliando-a pelos parâmetros físico-químicos desde a gelificação/hidrólise da massa de mandioca com enzimas comerciais e fungos isolados, adquiridos a partir dos beijos utilizados no método tradicional embolorado por microrganismos nativos até a destilação. E através de resultados obtidos pelos processos propostos assegurar sua viabilidade principalmente aos pequenos produtores.

2 MATÉRIA-PRIMA

2.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária do Brasil, especificamente na região amazônica, exerce importante papel no cenário agrícola nacional e internacional, tanto como fonte de energia para a alimentação humana e animal, quanto geradora de emprego e de renda, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. É um dos principais produtos, em área plantada, da Região Norte, consumido em forma de farinha, onde é produzida de forma artesanal, por isso, existe um desperdício considerável nessa forma de produção primária.^{12,13}

A industrialização aparece como uma alternativa que permite um melhor aproveitamento da mandioca na fabricação de produtos, que podem ser direcionados para o consumo humano, na forma de farinhas cruas ou torrada e polvilhos, e também para consumo animal, na forma de raspas e resíduos da própria indústria, ou transformado em fécula ou amido para fabricação de produtos. É uma raiz com alto teor de amido bastante cultivada em regiões tropicais.¹²

A mandioca é reconhecida como uma raiz amilácea, onde o amido se encontra juntamente com os outros carboidratos de diferentes pesos moleculares, incluindo desde açúcares simples até glicosídeo e material celulósico. Possui uma grande quantidade de carboidratos em sua composição, por isso proporciona um grande potencial para geração de etanol. No Brasil, em períodos de grandes dificuldades energéticas (1930 e 1970), chegou-se a implantar algumas usinas de álcool de mandioca. Devido a falta de estudos e investimentos, a produção de álcool de mandioca foi abandonada, enquanto a produção de álcool de cana de açúcar foi aperfeiçoado em diversos aspectos tecnológicos e econômicos.¹⁸⁻²⁰

A mandioca é uma raiz de tuberosa da família *Euphorbiaceae*, rica em amido e muito consumida na dieta brasileira. É uma cultura que pode ser encontrada tanto em terras de alta fertilidade, como é o caso do sul do país, como no semi-árido, em algumas regiões do Nordeste.¹⁹ A cultura da mandioca é de fácil desenvolvimento, tolerante a pragas e doenças, sendo pouco exigente quanto a condições climáticas, porém, tem baixa resistência ao frio e apresenta um período de crescimento longo e potencial de deterioração alto fora do solo. As mudanças ocorrem depois de dois ou

tres dias da colheita devido a processos fisiológicos . A conservação pode ser feita por meio do processamento em farinha, raspas secas, polvilho, puba, entre outros produtos.^{19,20}



Figura 1. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)
Fonte: (AUTOR)

Os glicosídes cianógenios são toxinas naturais encontradas em espécies de plantas. Na mandioca, o cianeto é proveniente da degradação dos glicosídeos cianogênicos linamarina e lotaustralina. Este vegetal é considerado como sendo, o que apresenta maior concentração destas toxinas, os quais sob a ação de ácidos ou enzimas sofrem hidrólise e liberam acetona, açúcar e ácido cianídrico (HCN). A variação da concentração destes compostos nas raízes é que possibilita a classificação prática em mandiocas doces ou mansas e amargas ou bravas. Devido à toxicidade da planta, seu emprego na alimentação humana e animal é limitado. o ácido cianídrico é volátil e durante o processo de fabricação da farinha e fécula ou durante a cocção da mandioca é quase que totalmente eliminado.¹⁹⁻²¹

2.2 Amido

O amido é um polímero de fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$, composto de carbono, hidrogênio e oxigênio, nas proporções 6:10:5, pode ser considerado um produto da condensação de unidades de anidro glicose. É basicamente constituído por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina, e apresenta-se em forma de grânulos insolúveis em água fria, cujo tamanho e forma são característicos da

planta de origem. É a mais importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores, ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos, é o produto final do processo fotossintético.²¹⁻²³

A formação do amido ocorre devido à atividade combinatória de algumas enzimas, tanto nas organelas fotossinteticamente ativas, onde o amido é reserva temporária, quanto nos amiloplastos de órgãos de reserva. Ocorre também em algas e, pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido, é um dos elementos mais importantes da alimentação humana. Apresenta-se na forma de grãos, cuja aparência varia de acordo com a origem. Suspensões de amido em água, por aquecimento formam géis e no processo da gelificação tornam-se translúcidos.^{22,23}

As substâncias amiláceas transformam-se em açúcares fermentescíveis após sofrer hidrólise. Os amidos são utilizados na indústria de alimentos devido, principalmente, à presença de amilose e amilopectina que estão em sua composição. A amilose é um polímero de cadeia linear contendo ligações glicosídicas tipo α (1-4), apresenta peso molecular de $1,5 \times 10^5$ a 10^6 g/mol. As amilopectinas são de cadeia ramificada onde cadeias de 1-4 α -D-glucana possuem conexões axiais tipo 1-6 α -D-glucana a cada 20-25 unidades de glicose da cadeia linear e peso molecular da ordem de 5×10^6 a 10^8 g/mol. Estes polissacarídeos estão presentes nos grânulos de amido em diferentes proporções e, em função de suas estruturas moleculares, conferem características de viscosidade, solubilidade, poder de gelificação ou de adesão, e outras, diretamente relacionadas à sua origem botânica. O amido de mandioca por se hidrolisar com maior facilidade, leva vantagem em relação a outros tipos de amidos.^{24,25}

2.2.1 Estrutura do Amido

A fórmula geral do amido é $(C_6H_{10}O_5)_n$. As unidades de glicose estão ligadas entre si pelos carbonos $C_1 - C_4$ e $C_1 - C_6$, através de oxigênio, formando ligações glicosídicas α -(1-4) e α -(1-6).¹¹ O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos denominados *amilose* e *amilopectina*, em proporções que variam entre os amidos procedentes de diferentes espécies vegetais, e mesmo entre amidos provenientes da mesma espécie. As proporções desses polissacarídeos variam de acordo com o grau de maturação das plantas. É produzido em grande quantidade nas folhas dos vegetais como forma de armazenamento dos produtos da

fotossíntese. As proporções de amilose e amilopectina influem na viscosidade e no poder de gelificação do amido.²³

A amilose é um polissacarídeo linear, formado por unidades de D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas α - (1-4), em quantidades que variam de 200 a 10.000, as ligações glicosídicas na configuração α conferem à amilose uma estrutura helicoidal. A estrutura helicoidal da amilose é também responsável pela formação de complexos com alguns compostos orgânicos, como álcoois alifáticos de cadeia não ramificada. A formação do complexo de amilose com n-butanol é um dos métodos para a separação da amilose de uma mistura de amilose e amilopectina. Este composto é também um complexo de inclusão, no qual o n-butanol é envolvido fortemente pela estrutura helicoidal da amilose e, nesse processo, grande quantidade de água de solvatação é deslocada, tornando a amilose muito menos solúvel, e facilmente cristalizável. Em alimentos, os lipídeos existentes também podem ser envolvidos pelas hélices da amilose do amido presente, o que pode ter influência na digestibilidade do amido.¹⁸ A ligação entre os átomos de carbono das unidades de glicose são do tipo α - (1-4).²⁴⁻²⁶

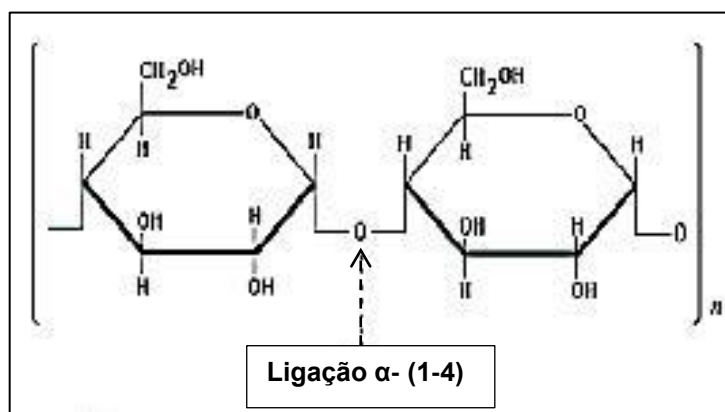


Figura 2. Estrutura química da molécula de amilose
Fonte: (CEREDA, 2001)

A amilopectina é um polissacarídeo que constitui a fração mais ramificada do amido com forma não totalmente esférica, devido sua estrutura não ser perfeitamente formada. É composta por várias cadeias constituída de 20 a 25 unidades de α -D-glucopiranoose unidas em (1-4); essas cadeias, por sua vez, estão unidas entre si por ligações α - (1-6), constituindo essas ligações de 4 a 5% do total das ligações glicosídicas. As ramificações aparecem a cada 24-30 moléculas de

glicose. A ligação entre as unidades de glicose também é do tipo α - (1-4), na mesma cadeia. Porém, unindo duas cadeias aparecem ligações do tipo α - (1-6). A amilopectina apresenta um grau de polimerização da ordem de 10^4 a 10^5 , tem massa molecular de $0,5 \times 10^8$ a 10^9 e o comprimento das ramificações é variável. A amilopectina apresenta coloração vermelha quando em contato com solução de iodo. A disposição da amilose e da amilopectina no grânulo de amido leva a formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde a amilopectina está concentrada é mais densa e cristalina, por isso, dificulta a entrada de moléculas como a de água e enzimas, apresentando-se mais resistente ao processo de hidrólise.²⁴⁻²⁶

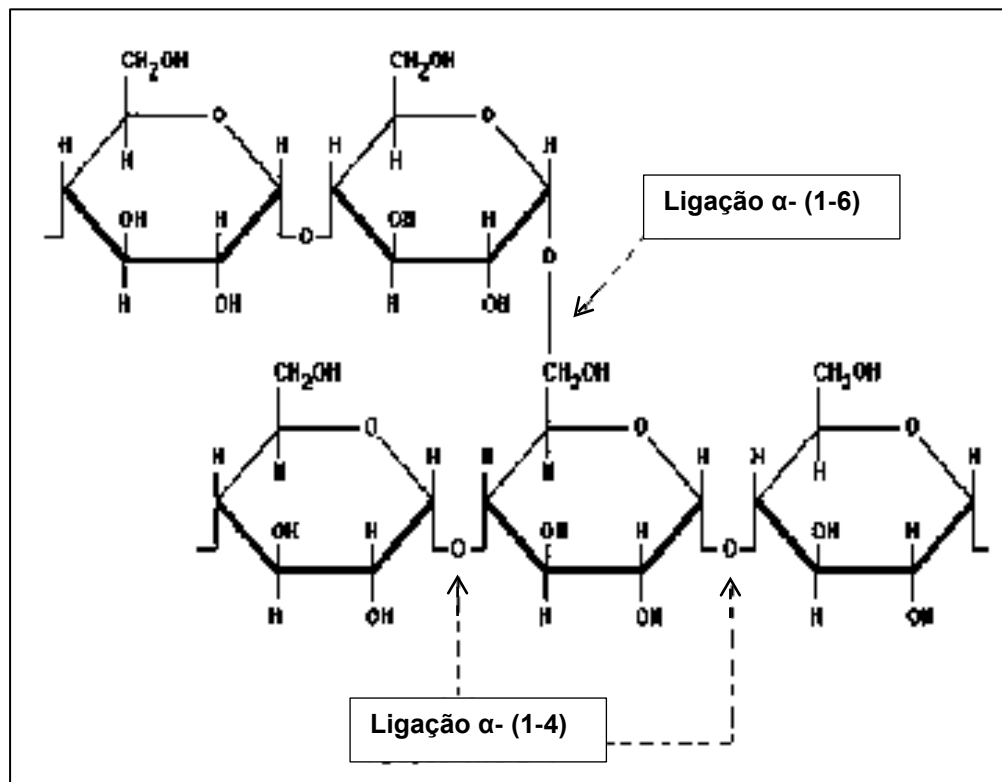


Figura 3. Estrutura química da molécula da amilopectina
Fonte: (CEREDA, 2001)

2.2.2 Gelificação do Amido

Para o processo de hidrólise, primeiramente prepara-se a matéria-prima, em seguida faz-se a gelificação e por fim a sacarificação. Essas operações visam transformar o amido em açúcares fermentescíveis. A gelificação consiste na

transformação do amido em goma, por meio da hidratação e cozimento. Os grãos de amido se encontram no interior das células e pelo cozimento, as paredes de natureza celulósica que contém os grãos de amido são rompidas, assim, este absorve a água e se gelatiniza. A temperatura em que ocorre a gelificação depende da origem botânica do amido. Para fécula de mandioca, a temperatura é menor que para cereais, o que implica em menor consumo energético e maior facilidade de transformação nessa fase.^{27,28}

O amido após sofrer gelatinização não é diretamente assimilável pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, reponsáveis pela fermentação alcoólica. Torna-se necessário, portanto, proceder à uma hidrólise ou sacarificação do amido em açúcares, os quais apresentam constituição molecular mais simples. O fenômeno de gelatinização ou gelificação do amido é extremamente importante para vários alimentos.²⁷⁻³⁰

Nas zonas amorfas os componentes que expandem são amilose e um pouco de amilopectina. Essa expansão é limitada por ser severamente restringida pelas camadas essencialmente contínuas de amilopectina cristalina. O grau de expansão é reversível porque as camadas não são perturbadas. Na presença de água e calor os grânulos de amido expandem-se embebendo água. Com o aquecimento, a temperatura de gelatinização é atingida e uma pasta é formada.²⁷⁻³⁰

2.2.3 Sacarificação do amido de mandioca

A sacarificação é o processo de transformação do amido ou fécula infermentescível em açúcares fermentescíveis. Ela é feita por hidrólise química ou enzimática, liberando assim, açúcares fermentescíveis. A via enzimática pode ser conseguida com o uso de enzimas amilolíticas, enquanto a via química através de ácidos, calor e pressão. A sacarificação enzimática é processada por ação de enzimas do malte ou pela ação dos micro-organismos de certos fungos. Os produtos resultantes da hidrólise de amido por enzimas constituem importantes produtos comerciais e contém desde maltodextrinas e ciclodextrina até os açúcares mais simples. OS amiláceos são sacarificados devido os agentes de fermentação (leveduras) não possuírem enzimas amilolíticas.. Os produtos de conversão enzimática do amido vão desde a glicose a dextrinas de elevado peso molecular. O amido é um polissacarídeo constituído de cadeias normais e ramificadas formado

por moléculas de várias centenas de unidades de glicose, ligadas entre si por ligações α - (1-4) e α - (1-6), que pode converter-se em açúcares. Dentre os processos de hidrólise citados, o enzimático é o mais vantajoso, em consequência, diferentes micro-organismos com propriedades amilolíticas têm sido estudados.^{31,32}

O processo de hidrólise envolve principalmente o rompimento das moléculas do amido em fragmentos de baixo peso molecular, e tem como consequência o aumento do número de moléculas lineares menores que as moléculas de amilose do amido natural, o que resulta no aumento da tendência de retrogradação sob resfriamento e repouso do amido gelatinizado. Quando o amido gelatinizado é armazenado e resfriado, ele pode sofrer um fenômeno denominado de retrogradação, portanto, a hidrólise é um pré-tratamento que visa aumentar as possibilidades de se obter açúcares redutores e retrogradação do amido.³¹⁻³³

A via enzimática pode ser conseguida com o uso de enzimas amilolíticas, obtidas através de vários agentes enzimáticos, tais como: o malte, farelo enzimático, enzimas comerciais purificadas. O procedimento enzimático é sem dúvida a forma mais eficiente de transformação do amido, entretanto, apresenta um custo elevado para o utilização de enzimas, enquanto que a hidrólise ácida apresenta menor custo, mas, em compensação, não se tem muito controle sobre o rompimento que o ácido empregado realiza na molécula de amido.³²⁻³³

A hidrólise do amido tem por base o fato de que a ligação glicosídica é estável em condições alcalinas, mas é hidrolisada em condições ácidas. As enzimas amilolíticas são compostos de natureza protéica que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica.³²⁻³⁴

A hidrólise ácida é eficiente e relativamente barata, porém gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Por isso, a sacarificação enzimática tem sido objetivo da maior parte dos estudos. O processamento de hidrólise com o uso de enzimas apresenta possível redução de custos em longo prazo, pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperaturas, pressão e agressividade química. O processo enzimático é menos poluente que o por via ácida.⁵⁴ As enzimas usadas para a sacarificação são as α -amilase e a amiloglicosidase (AMG). A primeira atua no interior da cadeia de amido, quebrando-a em oligossacarídeos de menor peso molecular. A amiloglicosidase, por sua vez, atua nos extremos da molécula, liberando

unidades sucessivas de glicose.³¹⁻³⁴

Na utilização de enzimas para o processo de hidrólise, se a sacarificação não for completa, parte do amido permanece na forma de dextrinas que não são fermentescíveis, por ainda conterem algumas ligações de glicoses. Se as enzimas são bem selecionadas não sobram dextrinas e o rendimento é elevado.^{33,34}

2.3 Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. São proteínas catalizadoras, que tem o formato de chave e substrato para facilitar o reconhecimento nas reações químicas, os fatores que podem influenciar é alta temperatura, que poderá causar desnaturação dessa proteína, pH alto pode também interferir na ação da enzima. Se uma enzima é quebrada em seus aminoácidos componentes, sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para sua atividade catalítica. Algumas enzimas não requerem nenhum grupo químico para atividade além dos grupos aminoácidos.³⁵⁻³⁷

As enzimas são substâncias orgânicas formadas por estruturas químicas complexas. São substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas, compostas por polímeros de aminoácidos. São inativadas pelo calor e esta talvez seja a característica mais importante destes compostos em relação à tecnologia de alimentos.^{35,36}

A principal fonte de obtenção de enzimas são os microrganismos, embora muitas enzimas de aplicação industrial tenham sua origem nos tecidos animal ou vegetal. A ação catalítica das enzimas se faz como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução da energia de ativação da reação ou alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzir significativamente a energia de ativação, as enzimas apresentam alta especificidade, que pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato. Apenas alguns resíduos aminoácidos participam diretamente da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação e posicionamento da molécula de substrato.³⁵⁻³⁷

As enzimas são muito específicas para os seus substratos. Esta

especificidade pode ser relativa a apenas um substrato ou a vários substratos ao mesmo tempo. O termo amilase, por exemplo, indica a ação sobre o amido que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose e a amilopectina.^{35,36}

2.3.1 Enzimas Amilolíticas

As enzimas amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações α -(1,4), são responsáveis pela degradação do amido e estão largamente difundidas na natureza. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, que atuam no interior do substrato rompendo as ligações, chamadas de endoamilases; as β -amilases, que atuam nas extremidades hidrolisando unidades não redutoras do substrato, chamadas de exoamilases; e as glucoamilases que liberam unidades de glicose do terminal não redutor do substrato, chamadas de amiloglicosidase.^{37,38}

As amilases atuam sobre as ligações glicosídicas do amido. Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas para produção de xaropes, álcool, bebidas. No processo de hidrólise, a α -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao acaso as ligações α -(1,4), por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glicose. A β -amilase, ataca a extremidade não-redutora da amilose, resultando em sucessivas unidades de maltose. A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α -(1,4) próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α -(1,6), não são hidrolisadas por essas enzimas. Portanto, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original, denominado dextrina limite é o produto dessas enzimas. Outra enzima, a α -(1,6), glicosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glicose e maltose.^{38,39}

Para que ocorra o processo de liquefação e sacarificação, a α -amilase rompe as ligações α -(1-4), casualmente dentro da molécula de amido, de modo que se formam pequenas cadeias de dextrose, denominadas dextrinas. Com isso, a pasta torna-se gelatinizada, ficando menos consistente e formando maior número de terminais de cadeias para a ação das enzimas sacarificantes. A α -amilase não quebra as ligações α -(1-6), permanecendo todos os pontos de ramificação intactos após o tratamento com a α -amilase. Por esta razão, esta enzima é comumente denominada de enzima liquidificante. Outra enzima que atua no amido é a α -glicosidase, que ataca as ligações α -(1-4), das moléculas de maltose e, em menor grau, as dextrinas,

formando glicose.³⁶⁻³⁹

A α -amilase fúngica possui caráter ácido, é solúvel em água. O pH ótimo para sua ação está entre 5,0 e 6,0. Sua atividade diminui rapidamente em temperaturas acima de 50°C, mas na presença de um excesso de íons cálcio a desativação pode ser diminuída. A faixa ótima de temperatura para atividade das α -amilases é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte, sendo que as bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima em torno de 70°C. Pode ser inibida por íons de metais pesados, como o mercúrio, a prata e o chumbo.³⁷⁻³⁹

A β -amilase (α -1,4-glucan maltohidrolase) é encontrada nos vegetais superiores, é sacarógena, hidrolisa as ligações glicosídicas α -(1,4), de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão. As β -amilases são obtidas a partir de grãos de gramíneas não germinadas. A β -amilase cristalina é obtida a partir de grãos de trigo, cevada, batata e das sementes da soja.³⁶

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante produzida por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*. É utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α -(1,4) e α -(1,6). A produzida de fungos da espécie *Aspergillus* é a mais termoestável. Atua lentamente no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose. A amiloglucosidase catalisa eficientemente a hidrólise do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura.. A atividade máxima ocorre em temperaturas entre 50°C e 60°C. É encontrada na forma de duas isoenzimas, o que contribui para que apresentem diferentes especificidades.⁴²

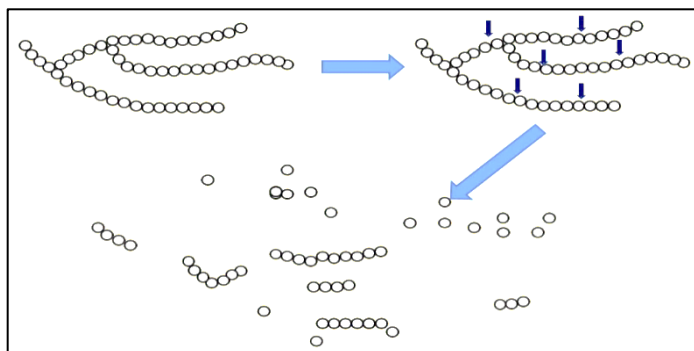


Figura 4. Ação das Enzimas Amilolíticas sobre uma molécula de amido. As flechas indicam os pontos em que as ligações são rompidas.

Fonte: (SPIER, 2005)

2.4 Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos conhecidos popularmente como mofos e bolores. Pertencem ao Reino Fungi e são constituídos, na maioria, por sistemas de hifas, que obtêm nutrientes por absorção. Estes organismos estão presentes no solo, no ar, em matéria orgânica e também em ambientes aquáticos. No entanto, na maior parte das vezes, são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, seja parasitando plantas ou causando problemas de saúde como alergias e micoses tanto em humanos quanto em animais. São organismos eucarióticos não fotossintéticos, possui parede celular, com algumas exceções. Alimentam-se por absorção e não possuem clorofila. São unicelulares, alguns são multicelulares e macroscópicos.⁴³

A nutrição dos fungos é realizada através da absorção, com exceção das leveduras que são geralmente unicelulares, acumulam glicogênio como substâncias de reserva e têm forma de vida diversificada desde saprobiontes, comensal, simbiontes e parasitas. Os fungos formam esporos, que são dispersos por corrente de ar. A maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas. As células móveis não são encontradas em fungos terrestres.^{43,44}

Os fungos (bolores) e leveduras são micro-organismos de alta importância na conservação dos alimentos. A importância das leveduras reside no fato de serem eventuais agentes de deterioração em alimentos nos quais apresentam condições ótimas de desenvolvimento. É interessante observar que, dependendo do tipo de alimento e suas características básicas, uma mesma espécie de levedura pode ser considerada benéfica e essencial ao processo tecnológico, ao passo que, em outro produto, ela pode se constituir em agente de deterioração. Enquanto o crescimento de bolores é devido ao desenvolvimento do micélio fúngico, constituído de um aglomerado intrincado de hifas, com aspecto variável, de seco e pulverulento a úmido e gelatinoso, compacto ou pouco denso, com aparência cotonosa. O micélio apresenta-se geralmente incolor, embora em algumas espécies haja produção de pigmentos.⁴⁵

Os fungos são explorados de diversas formas, principalmente nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosmética e têxtil, que utilizam o seu potencial de produção de ácidos cítricos, fumárico e gálico para fabricação de seus produtos.³⁴

2.4.1.1 Fungos Filamentosos

O grupo dos fungos microscópicos inclui as leveduras que são constituídas de estruturas unicelulares e os fungos filamentosos formados de estruturas pluricelulares. Os fungos filamentosos são compostos por hifas (micélio), segmentadas ou não. No final das hifas, em geral, encontram-se as estruturas produtoras de esporos, responsáveis pela reprodução.⁴⁶⁻⁴⁹

Os fungos filamentosos são formados e constituídos a partir de estruturas de frutificação que germinam dando origem a tubos germinativos que crescem, formando as hifas ou filamentos. O septo serve para promover a individualização das células que compõem as hifas. Desse modo, no segmento intermediário de dois septos têm-se uma célula e, conseqüentemente, um núcleo. Apesar de o septo estar presente a individualização não ocorre completamente, pois os septos apresentam poros interligando o citoplasma de uma célula com outra. Em se tratando de hifas cenocíticas, essas são visualizadas como uma estrutura contínua composta de vários núcleos. O crescimento da hifa ocorre por alongamento de suas extremidades.⁴⁷⁻⁴⁹

Os fungos filamentosos estão bem difundidos na natureza, estando presente no solo, no ar, na água e em matéria orgânica em decomposição. São conhecidos vulgarmente como bolores ou mofo, elaboram numerosos metabólitos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, álcoois, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas. Os fungos filamentosos microscópicos são predominantemente pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução sexuada e/ou assexuada. Seus esporos ou conídios, estruturas reprodutivas de origem sexuada ou assexuada respectivamente, são originários da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos.^{47,48}

Os fungos filamentosos podem se desenvolver em produtos com atividade aquosa baixa. Entretanto, alguns fungos filamentosos xerofílicos podem se multiplicar em produtos com menores atividades de água, esse grupo ainda é de importância em alimentos conservados pelo uso do açúcar, do sal e desidratados. Multiplicam-se em uma ampla faixa de pH entre 2,0 e 8,5, tornando-se importante grupo para produtos ácidos (frutas e produtos de frutas, conservas ácidas, vegetais fermentados e outros). São os principais deteriorantes de alimentos, onde se multiplicam com

grande facilidade. com pH inferior a 4,0 - 4,5.⁴⁷⁻⁴⁹

Os fungos se reproduzem por meio de esporos. Em condições favoráveis, o esporo absorve água, aumenta de tamanho e germina emitindo um tubo germinal, que se alonga por crescimento da extremidade distal e se tornam filamentosos, longos e se ramificam. A estrutura produtora de esporo é chamada esporóforo. Quando a extremidade terminal do esporóforo forma um saco, esse é chamado esporângio e o esporóforo de esporangióforo. Os esporos contidos em tais estruturas são denominados esporangiósporos. Quando estes estão maduros, o esporângio se rompe pela pressão interna ou é desenvolvido por enzimas secretadas, e então os esporangiósporos são libertados.⁴⁹

2.4.1.1 Fungos do gênero Aspergillus

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencem à família das Aspergillaceae e à classe dos Ascomicetos. Estes organismos apresentam um talo filamentoso constituído por hifas septadas, com ramificações dicotômicas fazendo ângulos de 45°, mostrando estruturas de reprodução assexuada situadas no cimo de uma vesícula terminal com forma variável e que é o prolongamento do conidióforo. As espécies que compõe este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos.^{49,50}

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio. A taxonomia atual reconhece cento e cinquenta espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente trinta destas são bem definidas.⁵⁰

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso denominado “mofo negro”, exibe características particulares como: colônias brancas a amarelo pálido, ligeiramente forma milhares de esporos. Apresenta conídios esféricos, medindo de 3 a 5 µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. Esse tipo de fungo tem hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros. São

microorganismos ideais para aplicações industriais, por apresentar boa capacidade de fermentar uma grande variedade de matéria-prima de baixo custo, facilidade de manipulação, produzir rendimentos elevados de bioprodutos e altos níveis de secreção de enzimas.^{51,52}

Algumas espécies de fungos *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*) são patogênicas para homens e animais. A maioria das infecções sistêmicas em humanos é encontrada em pacientes imunodeprimidos. Embora a espécie *Aspergillus niger*, seja geralmente não patogênica, inalação de grande quantidade de esporos pode levar a doença pulmonar (aspergilose). A OMS (Organização Mundial de Saúde), criou oportunidade para utilização de *Aspergillus niger* na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas, por considerar inofensiva a ingestão oral dessa espécie.⁵⁰⁻⁵²

2.4.1.2 *Fungos do gênero Rhizopus*

O fungo do gênero *Rhizopus* pertence ao filo Eumycophyta. O prefixo “rhizo” é relacionado às raízes, o sufixo “pus” deve-se aos rizoides da base dos esporangiósporos ou das hifas que são característicos de algumas espécies desse gênero. São considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, constituindo um emaranhado chamado micélio.⁴⁸⁻⁵⁰

Os fungos *Rhizopus* estão espalhados pelo solo, especialmente em terrenos turfosos ou úmidos, no estrume, na poeira do ar, em alimentos e nos utensílios em péssimas condições higiênicas. O *Rhizopus* ssp pertence ao grupo dos ficomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta. Apresentam micélio ramificado e desarranjado. A reprodução efetua-se por germinação de esporos. Os esporos maduros são liberados dos aparelhos esporíferos e disseminados. Um esporo germina e libera um filamento ou hifa que cresce, para dar um novo micélio. Seus esporos são de natureza assexuada.^{48,49}

2.4.1.3 *Fatores que influenciam no crescimento dos fungos*

Os fungos necessitam de condições mínimas (fatores nutricionais e físicos) necessárias para o seu crescimento. Na produção de amilases por fungos e

bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases.^{43,44}

Os principais fatores que influenciam o crescimento dos fungos nos alimentos são a concentração de íons de hidrogênio, a atividade de água, o potencial de oxirredução, os nutrientes e a presença ou ausência de substâncias inibidoras. Os fungos são aeróbicos e seu crescimento é estimulado pelo fornecimento farto de oxigênio, desenvolvendo-se em ampla faixa de temperatura.^{43,44}

Os fungos da flora microbiana dos cereais podem ser classificados de acordo com a etapa na produção de alimentos que invadem os grãos e sementes de campo ou de armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas depende das condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos, nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. A flora microbiana dos cereais geralmente é constituída pela flora do solo, do ambiente e dos locais onde são armazenados os grãos, e por contaminações ocorridas no processamento. Estes fungos podem ser classificados, de acordo com a etapa na produção de alimentos que invadem os grãos e sementes, em fungos de campo ou de armazenamento. Os fungos apresentam grande capacidade de colonização e exploração de substratos orgânicos vivos em decomposição.⁵⁶

Os fungos utilizam o nitrogênio na síntese de ácidos nucleicos, algumas vitaminas, aminoácidos, proteínas e enzimas. O nitrogênio é encontrado no solo na forma de nitrato ou amônio, sendo ambos absorvidos pelo fungo no momento em que são requeridos nos processos metabólicos. Porém, quando o fungo é cultivado em laboratório, se o meio e cultura in natura não fornecer uma quantidade necessária desse nutriente, uma suplementação deve ser realizada. As fontes de nitrogênio podem ser inorgânicas na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio, ou orgânicas na forma de uréia, aminoácidos ou extrato de levedura. A utilização destes compostos depende do tipo de micro-organismo utilizado.⁵⁷⁻⁵⁹

3 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

5.1 Leveduras Alcoólicas

O processo de fermentação alcoólica ocorre com a transformação da matéria-prima em álcool por microrganismos, usualmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Para um bom rendimento de fermentação é muito importante que se adicione ao mosto uma quantidade de leveduras capaz de converter os açúcares em álcool e gás carbônico, dentro de determinadas condições. Nas destilarias, estes microrganismos são chamados de pé-de-cuba ou simplesmente fermento.^{59,60}

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico, em que os mostos preparados devem ser inoculados com as leveduras, que são os microrganismos responsáveis pela transformação de açúcar em álcool etílico. Esse processo bioquímico é realizado por enzimas, e pode ser considerado como a oxidação anaeróbica parcial, da glicose. Para que as fermentações ocorram de forma satisfatória, é necessária que se adicione aos mostos uma quantidade ajustada de microrganismos capazes de transformar os açúcares em álcool e gás carbônico. É um processo de grande importância, no qual são obtidos todos os alcoóis industriais e todas as bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas e, como produto secundário, o gás carbônico. É ainda utilizado na produção de leveduras de panificação e na obtenção de leveduras prensadas.⁵⁸⁻⁶⁰

No processamento de mandioca para produção de álcool ou aguardentes as leveduras transformam o açúcar proveniente da hidrólise do amido da mandioca em etanol, liberando gás carbônico. Emprega-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, que é a mesma empregada na produção de álcool de cana-de-açúcar. Para iniciar a fermentação, é necessário misturar o inóculo de leveduras ao mosto, mantendo as condições adequadas para o desenvolvimento dos microrganismos. O controle de temperatura, pH, adição de nutrientes e concentração da levedura devem ser adequados e ajustados para que não ocorra desequilíbrio e cause pouca conversão em etanol no processo e consequentemente não afetem o rendimento da fermentação.^{58,59}

Nos processos de fermentação geralmente a temperatura ótima é estabelecida entre 26°C e 32°C. O pH deve ser baixo (4,0 a 4,5) para inibir a ação de bactérias. A concentração de sólidos solúveis do mosto deve estar entre 12 a 14 graus Brix para que não ocorra inibição da própria levedura.⁵⁸⁻⁶⁰

Todo líquido açucarado pode ser fermentado e recebe a denominação de mosto. A composição química do mosto é outro aspecto importante na produção de álcool e aguardentes, haja vista que as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais diferenciadas durante o processo de fermentação alcoólica. A disponibilidade de nutrientes influencia a multiplicação e o crescimento celular, bem como a eficiência da transformação de açúcar em álcool. Em alguns casos pode ser necessária a suplementação de nutrientes, adição de antissépticos e aumento da temperatura para se obter rendimentos satisfatórios. Na suplementação usa-se nitrogênio, devido à sua importância para as leveduras, por ser um elemento essencial para a multiplicação e crescimento do fermento.^{58,59}

Durante a fermentação alcoólica, ocorre o consumo dos açúcares pelos microrganismos (leveduras) com formação de álcool etílico e dióxido de carbono. Geralmente, há, a formação de pequenas quantidades de outros componentes (produtos secundários da fermentação alcoólica), tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres e álcoois superiores.⁵⁸

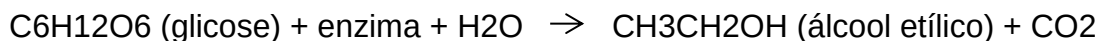


Figura 5. Conversão da glicose a etanol e dióxido de carbono

3.1.1 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie de levedura mais comumente encontrada é a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida vulgarmente como levedura de padeiro ou da cerveja. É largamente disseminada na natureza, porém, esta espécie é mais frequentemente associada com fermentações industriais, em particular as fermentações para produção de bebidas alcoólicas, panificação e etanol. Faz parte da Biotecnologia tradicional, pelo seu uso na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade de produzir álcool e dióxido de carbono.⁶⁰

Devido a sua grande disponibilidade na forma de levedura prensada, tornam-se importantes fontes de obtenção de uma grande variedade de enzimas. As células da *Saccharomyces cerevisiae* possuem geralmente formato elipsóide, sendo que o

maior diâmetro das células varia entre 5 e 10 μm e o menor diâmetro varia entre 1 a 7 μm . A média dos volumes celulares é de 29 ou 55 μm para as células haplóides e diplóides, respectivamente, e o tamanho celular aumenta de acordo com a maturação da célula. Este tipo de levedura tem rápido crescimento celular, alta tolerância a etanol e uma eficiente produção de etanol. É constituída por proteínas de qualidade e tem sido associada por séculos à produção de bebidas e alimentos.^{60,60}

As leveduras não fermentam o amido, porque sua estrutura é muito complexa, com número muito elevado de ligações entre moléculas de glicose. As leveduras do gênero *Saccharomyces*, que tradicionalmente são utilizadas na produção de etanol, não possuem habilidade de hidrolisar amido. Para a fermentação do amido são necessárias enzimas amilolíticas para hidrolisa-las em glicose, pois a *Saccharomyces cerevisiae* não produz estas enzimas.⁶¹

3.1.2 Levedura selvagem

As leveduras selvagens são aquelas que se apresentam estranhas ao processo de fermentação alcoólica, resultando em contaminação. Podem ser da mesma espécie utilizada no processo ou não. Essas leveduras causam queda no rendimento e na produtividade da fermentação, bem como na qualidade do produto desejado.¹⁻³

4 DESTILAÇÃO

Com o término da fermentação alcoólica, o vinho está apto para ser destilado. O processo de destilação inicia com a colocação do vinho separado dos materiais (resíduos de fermentação) mais grossos, na caldeira, para ser destilado. Os sólidos são basicamente constituídos pelas células de leveduras e bactérias, sais minerais, açúcares que não fermentaram e impurezas mecânicas em suspensão. O vinho não deve ocupar todo o volume da caldeira. A presença de células de leveduras, no vinho para destilar, é benéfica para a qualidade do destilado, uma vez que os ácidos graxos liberados atribuem características próprias ao destilado. No entanto, quantidades excessivas de ácidos graxos são prejudiciais. A seguir, acende-se o fogo na fornalha. A chama pode ser mais intensa no início, até quando o destilado começa a sair no condensador. Nesses momentos, a

intensidade da chama deve ser reduzida e a destilação deve continuar. A fase líquida do vinho é constituída pela água e pelo etanol, componentes mais importantes do ponto de vista quantitativo, e em quantidades menores pelos chamados compostos secundários, principais responsáveis pelas características sensoriais das bebidas destiladas.¹⁻³

No processo de destilação, a separação dos componentes da mistura se baseia na volatilidade de cada um desses elementos, numa dada temperatura e pressão. Na destilação, a mistura é aquecida até a ebulição, sendo que os vapores são resfriados até sua condensação. Se a mistura é bem heterogênea, composta por líquidos imiscíveis, o destilado será constituído pelo líquido mais volátil.¹⁻³

No processo de fabricação da tiquira, o líquido a ser destilado é o mosto fermentado ou vinho proveniente da hidrólise do amido de mandioca. Esta mistura é composta por componentes que coexistem na fase gasosa, líquida e sólida. O principal componente gasoso é o CO₂ formado na fermentação alcoólica do mosto. A fase líquida, que é a mais importante em termos quantitativos, é constituída por água, etanol e outros constituintes secundários, representados quimicamente por aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres, alcoóis superiores, glicerol, furfural. Na fase sólida encontram-se os sólidos insolúveis, constituídos por células de leveduras e bactérias, resíduos de mandioca, sais minerais, açúcares não fermentados, açúcares infermentescíveis.²⁰

Na obtenção de aguardentes, como a cachaça e tiquira, a destilação deve ser fracionada em três porções distintas para retirada de compostos indesejáveis:

Cabeça ou cabilouro: é a primeira fração destilada e contém a maior proporção de compostos mais voláteis, devendo ser separada do produto final, corresponde a cerca de 10% do destilado; rica em metanol, aldeídos etc;

Coração ou restilo: é a segunda fração. Trata-se da aguardente propriamente dita; é a parte nobre da destilação, corresponde a 80% do destilado, onde estão concentrados o etanol, ésteres e substâncias que caracterizam a bebida;

Cauda ou surrapa: é a última fração e, contém como a cabeça, elementos menos voláteis e compostos indesejáveis, devendo ser separada do produto final, corresponde aos 10% finais do destilado, contém óleos pesados (óleo fúsel) e outras substâncias indesejáveis.¹⁻³

5 PROCESSAMENTO DA TIQUIRA PELO MÉTODO TRADICIONAL

5.1 Principais operações unitárias

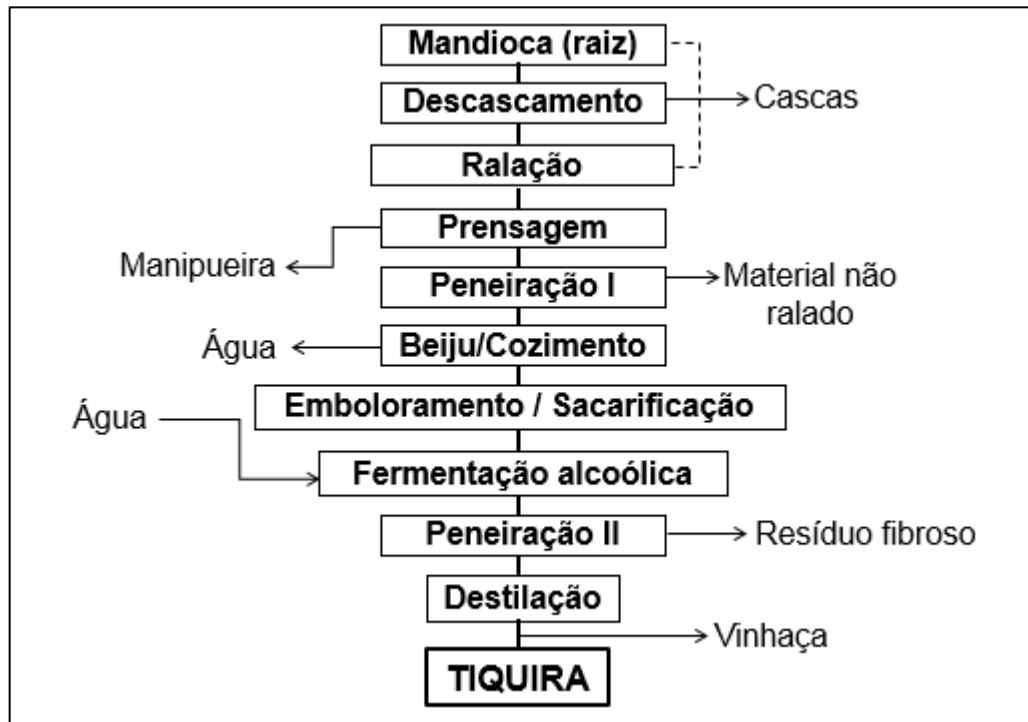


Figura 6. Principais operações unitárias
Fonte: (AUTOR)

A tiquira é uma aguardente preparada a partir da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz), é uma bebida típica do estado do Maranhão, de origem indígena, produzida por um processo artesanal, bastante primitivo. Apresenta graduação alcoólica de 36% a 54% por volume, a 20°C, obtida pela destilação do mosto de amido de mandioca fermentado.¹⁻³

No processamento da tiquira pelo método tradicional, a sacarificação é realizada por bolores (fungos nativos) e a fermentação por leveduras selvagens.

Para a fabricação da tiquira são necessárias três etapas: a) gelificação e sacarificação do amido de mandioca; b) fermentação alcoólica e c) destilação. A matéria-prima para a produção da tiquira é a raiz da mandioca ralada e moldada como beijus para ser assada em chapas de ferro ou cobre.¹⁻³

Inicialmente as raízes da mandioca são descascadas, raladas e prensadas. O descascamento geralmente é realizado manualmente com a utilização de facas. A

ralação é feita para que as raízes sejam trituradas e liberem os grânulos de amido permitindo a homogeneização da massa. O processo de trituração é realizado em um tipo de ralador composto por cilindro de madeira com serrilhas metálicas e fixado sobre uma mesa de madeira, denominado de *catitu*, como mostra a Figura 7. Após a massa ser ralada é colhida em cocho de madeira para ser prensada. O material obtido deve ser o mais fino possível, pois quanto mais fina for a massa, maior será o rendimento na fermentação.



Figura 7. Ralador de Mandioca (catitu)
Fonte: (AUTOR)

Terminada a ralação das raízes de mandioca, a massa deve ser prensada imediatamente para impedir a fermentação e o escurecimento da mesma. Este procedimento é realizado em prensas manuais (figura 8A), para reduzir, ao máximo, a umidade presente na massa ralada. A água colhida na prensagem é chamada "manipueira" (Figura 8B), que além de muito tóxica é poluente e deve receber um tratamento adequado para evitar a contaminação de córregos, rios e terrenos.^{2,3}

Em seguida, a massa é separada da porção mais grossa em peneira de palha, (figura 8C). As frações grosseiras (crueira) são separadas da massa e podem ser utilizadas na alimentação de animais. O material deve ser desintegrado para não atrapalhar na formação dos beijus.



Figura 8. Prensa manual (A), água de manipueira (B) e peneira de palha (C)

Na confecção dos beijos, espalha-se a massa sobre uma chapa aquecida a lenha em torno de 70 a 80 °C, formando uma torta com aproximadamente 30 a 35 cm de diâmetro e 8 a 10 cm de altura, (figura 9A) e deixa cozinhar até apresentar uma coloração apenas levemente dourada em ambos os lados do beiju, que está em contato com a chapa. Deve-se ter o cuidado para não deixar que a massa cozida queime ou fique seca. É fundamental que a torta tenha certa umidade para favorecer o crescimento dos fungos. Concluída esta etapa a torta passa a ser denominada de beiju.¹⁻³

Para que ocorra o emboloramento (figura 9B), os beijos serão cobertos com folhas de coqueiro ou bananeira e acondicionados em local (jiraus) que tenha pouca luminosidade, seja bastante úmido com pouca ventilação e quente, onde permanecerão por um período de aproximadamente 8 a 9 dias para o surgimento e desenvolvimento de fungos na superfície dos beijos que são necessários para sacarificação do amido. Passado esse período, os beijos poderão ficar secando ou ser usado imediatamente para fermentação.¹⁻³

Durante o período de emboloramento dos beijos, observa-se o crescimento de bolores com aspecto variável devido ao desenvolvimento do micélio fúngico. O micélio usualmente é incolor, embora em algumas espécies haja produção de pigmentos, conferindo-lhe uma tonalidade vermelha, amarela, castanha, cinza ou preta.^{2,3}



Figura 9. Beiju sendo assado (A) e embolorando do beiju no jirau (B)

Os beijus contendo amido sacarificado são esfarelados e colocados em fermentadores rústicos, denominados dornas (Figura A), que normalmente são cochos confeccionados de madeira. A fermentação é natural e feita por microrganismos que ocorrem naturalmente no meio.¹⁻³

Inicialmente uma quantidade de beiju correspondente a aproximadamente metade do volume do fermentador é esfarelada e colocada na dorna de fermentação. Acrescenta-se água suficiente para deixar toda massa bem úmida. Deixa-se a massa diluída em repouso por quatro dias. Passado este período, homogeneiza-se a massa diluída para ficar mais uniforme e completa-se o volume com água potável. O mosto é deixado fermentar por mais quatro dias. Para a conclusão das duas fases do processo, leva em média oito dias. O fim da fermentação é verificado quando diminui o borbulhamento que aparece na superfície do fermentado.¹⁻³

Finalmente o mosto fermentado é coado para a separação dos sólidos insolúveis. Este procedimento é feito para evitar que os resíduos queimem no fundo da caldeira do alambique e introduzam mau gosto na bebida, afetando negativamente a qualidade do destilado. A destilação da tiquira é feita em alambique simples (Figura 9B). Os alambiques mais utilizados são confeccionados de cobre, acoplados com serpentinas. O conjunto é bastante precário, onde o sistema de resfriamento não funciona devido muitas vezes a quantidade de água ser insuficiente para o resfriamento da serpentina. Geralmente o aquecimento da caldeira do alambique é realizado com a queima de lenha. A destilação é conduzida de forma branda, sem pressa durante todo o processo para evitar que o vinho entre em ebulição e provoque ebulição tumultuosa e em consequência turve a bebida.^{2,3}

Finalmente com o término da destilação, a tiquira está pronta para o consumo.



Figura 10. Dorna de fermentação (A) e Alambique de cobre(B)
Fonte: (AUTOR)

Dentre as características da tradicional tiquira, está a coloração levemente azulada, obtida através da adição de folhas de tangerina à panela do destilador para ser destilada juntamente com o vinho, mas que se torna volátil com o tempo. No entanto, adulterando essa coloração natural, produtores, atravessadores e comerciantes acrescentam uma substância de tonalidade forte (violeta), cujo princípio químico já foi identificado e quantificada, trata-se do corante violeta genciana (cloreto de hexametilpararosanilina), que é um produto industrializado não alimentício, é de uma espécie química bastante reativa no organismo, com indicações de ser multagênica, podendo provocar ulcerações no organismo. A comprovação do composto sugere que as autoridades alertem ou esclareçam aos consumidores sobre os possíveis malefícios à saúde.⁶

6 PROCESSAMENTO DA TIQUIRA PELOS MÉTODOS PROPOSTOS

Para a fabricação da tiquira pelo método tradicional ou por métodos modernos são necessárias três etapas: a) gelificação e sacarificação do amido de mandioca; b) fermentação alcoólica e c) destilação.

A sacarificação que é realizada por bolores nativos no método tradicional deverá ser substituída por enzimas comerciais e fungos isolados, enquanto a fermentação selvagem será suprida por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), usada em panificação.

Inicialmente em ambos os processos com a gelificação, a estrutura do amido

se abre e a viscosidade aumenta, permitindo que a enzima tenha acesso ao amido, para convertê-lo em açúcares. Para gelificar amido de mandioca, a temperatura necessária deve ser superior a 70°C. A suspensão de amido a ser liquefeita com o aquecimento, perde sua viscosidade, facilitando a sacarificação do amido em açúcares fermentáveis. Após a gelificação e sacarificação, a maior parte das ligações do amido é rompida. Para se obter um melhor rendimento em açúcares, deve ocorrer um maior rompimento de ligações na molécula do amido.¹⁻³

A conversão ou sacarificação do amido de mandioca é feita por hidrólise química ou enzimática liberando açúcares fermentescíveis. Quando uma solução de amido é tratada com ácido a quente, ocorrem sucessivas hidrólises até que suas moléculas sejam convertidas totalmente em glicose. Durante esse processo, são encontrados como produtos intermediários dextrinas e oligossacarídeos. A via enzimática pode ser conseguida com o uso de enzimas amilolíticas, obtidas através de vários agentes enzimáticos, tais como: o malte, farelo enzimático, enzimas comerciais purificadas. O procedimento enzimático é sem dúvida a forma mais eficiente de transformação do amido.^{2,3}

No processo de fermentação, as leveduras transformam o açúcar proveniente da hidrólise do amido da mandioca em tiquira, liberando gás carbônico. A levedura mais empregada é a *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, que é a mesma empregada na produção de aguardente de cana-de-açúcar. Para iniciar a fermentação, é necessário misturar o inóculo de leveduras à suspensão que contem açúcar, mantendo as condições adequadas para o desenvolvimento dos microrganismos e produção da aguardente. Temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e concentração da levedura são alguns dos parâmetros que afetam o rendimento da fermentação. A temperatura ótima para a etapa de fermentação se situa entre 26°C e 32°C. O pH deve ser baixo para inibir a ação de bactérias e deve estar entre 4,0 e 4,5. A concentração do mosto deve estar acima de 12,0 °Bx para não inibir a ação da própria levedura ao decorrer da fermentação.¹⁻³

As etapas da destilação são equivalentes ao processo utilizado para a aguardente de cana-de-açúcar. A primeira fração destilada é chamada de *cabeça* e corresponde a cerca de 10% do destilado; rica em metanol, aldeídos etc., deve ser separada do *coração ou restilo* que corresponde a 80% do volume do destilado, sendo a parte nobre da destilação, onde estão concentrados o etanol, ésteres e demais substâncias que caracterizam a bebida. A *cauda ou surrapa*, que

corresponde aos 10% finais do destilado, é também denominada de água fraca e contém óleos pesados (óleo fúsel) e outras substâncias responsáveis pela sensação de ressaca; assim como a cabeça deve ser também desprezada.¹⁻³

Nos processos propostos: Produção de tiquira com enzimas comerciais e Produção de tiquira com fungos isolados, o amido da massa de mandioca será convertido em açúcares por meio de um processo enzimático. Os açúcares presentes no mosto são fermentados por leveduras e o vinho resultante será destilado para a produção das aguardentes.

Para fabricação de tiquira utilizando enzimas comerciais serão usadas duas enzimas para a conversão do amido em matéria-prima fermentável: a α -amilase (Liquozyme® Supra), de origem bacteriana e resistente ao calor para a fase de liquefação, onde o amido perde sua viscosidade e Glucoamilase (AMG® 300 L), de origem fúngica, que converte o amido liquefeito e suas dextrinas em glicose para a sacarificação.

Para a fabricação da tiquira utilizando fungos isolados, de acordo com o cronograma apresentado no projeto de pesquisa, serão usadas cepas de fungos filamentosos potenciais produtores de enzimas α -amilase e amiloglicosidase na conversão do amido e posterior produção de tiquira.¹⁷

Trabalhos realizados com *Aspergillus niger* descreveram que taxas de inoculação de cerca de 10^6 a 10^7 esporos/g de suporte são suficientes para um bom crescimento dessa espécie de fungo.⁹² Observaram fenômenos de inibição da germinação dos esporos quando taxas de inoculação superior a 10^8 esporos/g de substrato são utilizadas.^{65,66}

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Bebidas do Campus Maracanã do Instituto Federal do Maranhão, Laboratório de Micologia do UNICEUMA, Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente (LDQA)-USP em São Carlos-SP e Laboratório de Análises de solo da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

7.1 Materiais

7.1.1 Mandioca

Para a realização dos experimentos foram adquiridos 30 quilogramas de mandioca de um mesmo lote, variedade “branquinha”, com 12 meses de idade, de um produtor rural, cultivada na propriedade Cajazeiras, município de Urbano Santos–MA. Utilizou-se amostras de massa de mandioca descascada e ralada, que foram identificadas, ambientadas em sacos plásticos e conduzidas até o laboratório.

7.1.2 Enzimas Comerciais

Duas enzimas comerciais foram utilizadas para a conversão do amido em matéria-prima fermentescível: a α -amilase (Liquozyme® Supra), de origem bacteriana e resistente ao calor para a fase de liquefação, onde o amido perde sua viscosidade e Glucoamilase (AMG® 300 L), de origem fúngica, que converte o amido liquefeito e suas dextrinas em glicose para a sacarificação.

A enzima Liquozyme Supra é um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de α -amilase termoestável, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheni-formes*. A enzima hidrolisa as ligações α -(1,4), do amilose e da amilopectina, convertendo rapidamente o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis. Esta enzima foi especialmente desenvolvida para promover a liquefação (dextrinização) do amido e produção de maltodex-trinas.

A enzima AMG 300 L é uma amiloglicosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações α -(1,4) e α -(1,6) do amido liquefeito. Durante a hidrólise, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A velocidade de hidrólise depende do tipo de ligação e do comprimento da cadeia. A AMG é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose.

As recomendações da indústria Novozymes Latin América Ltda. para essas enzimas são:

- Liquozyme Supra: 3 mililitros de enzima por quilograma de amido, faixa de temperatura: 90 a 105°C e pH (6,2 a 6,8).
- AMG 300 L: 2 mililitros de enzima por quilograma de amido, temperatura

ideal 58 a 70°C e pH (4,0 a 4,5).

7.1.3 Fungos isolados

Para os experimentos com fungos isolados foram utilizadas cepas de fungos *Aspergillus niger* encontradas em amostras de beijos mofados adquiridas diretamente de alambiques provenientes da propriedade rural Cajazeiras, município de Urbano Santos - MA, os quais foram *isolados, identificados, cultivados, conservados e quantificados*.⁶⁰ Estes fungos estavam disponíveis no Laboratório de Micologia da Universidade UNICEUMA.

As condições de cultura especificadas para os experimentos foram: taxa de inoculação: $5,5 \times 10^7$ esporos/g amido de mandioca; temperatura: 30°C; faixa de pH: 4,0 a 5,0; massa de mandioca/água: 1:10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 10% m/v.

7.1.4 Agentes de fermentação alcoólica

Para o processo de fermentação, usou-se fermento biológico comercial prensado fresco, marca Fleischman®.

As principais etapas dos processos de fabricação de tiquira utilizando enzimas comerciais e fungos isolados estão ilustradas na Figura 11.

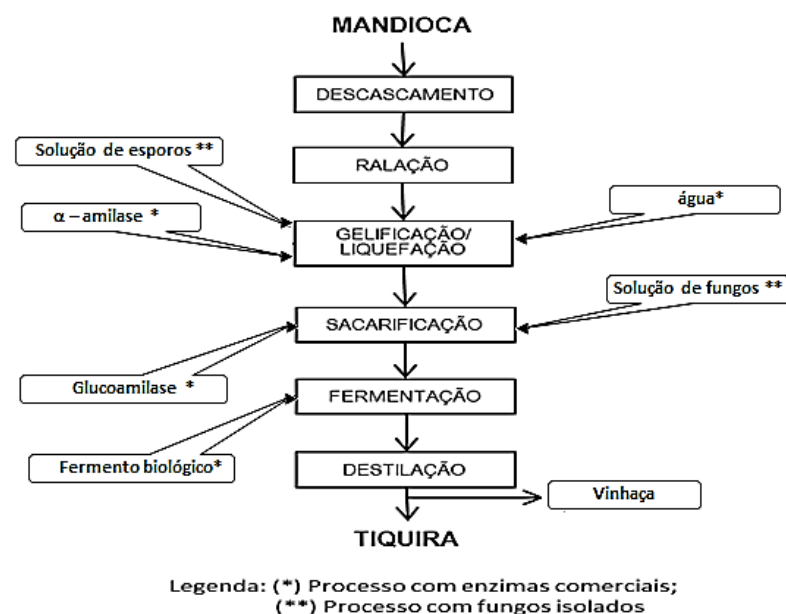


Figura 11. Fluxograma dos processos de produção de tiquira
Fonte: (AUTOR)

8 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TIQUIRA EMPREGANDO ENZIMAS COMERCIAIS E FUNGOS ISOLADOS.

Para concretização da produção das tiquiras foram realizados três experimentos com enzimas comerciais e oito utilizando fungos isolados.

O acompanhamento do processo de gelificação, liquefação, sacarificação e fermentação em ambos os processos, foi feito com leituras de °Bx em refratômetro (0-32%) e testes com solução de lugol (I_2+KI). Os valores de pH foram obtidos segundo o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).⁶²

8.1 Produção de tiquira empregando enzimas comerciais

8.1.1 Gelificação/liquefação do amido da massa de mandioca

Inicialmente foi adicionada a massa de mandioca, água (1:2 massa/água) e a enzima Liquozyme Supra (3 mL. kg^{-1} de amido), no tacho de aço inoxidável com capacidade para 20 litros. Fez-se a leitura do pH da suspensão que mediu 7,2 (faixa 6 a 8). Aqueceu-se lentamente até atingir à temperatura de 75°C, necessária para aumentar a viscosidade da massa. Continuou-se o aquecimento até a suspensão atingir 85°C. Manteve-se essa temperatura por 60 minutos, com agitação constante, durante o tempo necessário para liquefação do amido. Concluída essa etapa, deixou-se esfriar até 60°C. O acompanhamento para gelificação e liquefação foi realizado através da avaliação com solução de Lugol e a quantidade de sólidos solúveis medida em °Bx, utilizando refratômetro. Este procedimento pode ser visualizado na Figura 12A.

O cálculo da quantidade de enzima foi feito com base na quantidade de amido da mandioca, utilizando-se massa ralada de mandioca com 32,4% de amido em peso úmido.

8.1.2 Sacarificação do amido da massa de mandioca

Com o amido gelificado e liquefeito à temperatura de 60°C, ajustou-se o pH para 4,4 (4,0 a 4,5), com ácido cítrico a 40% m/v (2,08 $molL^{-1}$). Na etapa seguinte, acrescentou-se a enzima AMG 300L (2,0 mL de enzima. kg^{-1} de amido) sobre a

suspensão liquefeita anteriormente e deixou-se por 120 minutos em repouso para permitir a sacarificação. Finalmente, testou-se com solução de Lugol e leitura de sólidos solúveis. Ver Figura 12B.



Figura 12. Etapa de conversão do amido utilizando α -amilase (A) e Glucoamilase (B).
Fonte: (AUTOR)

8.1.3 Fermentação alcoólica

O mosto sacarificado foi resfriado até a temperatura de 30°C, e rebaixado o teor de sólidos solúveis para 12 °Bx com água potável. Ajustou o pH para 4,2 (faixa 4,0 a 4,5). Adicionou-se o fermento biológico na proporção de 10 g L⁻¹ sobre o volume total do mosto. A fermentação do mosto hidrolisado foi realizada em dornas de aço inoxidável com capacidade para 20 litros, conforme figura 13A. A temperatura foi controlada, para evitar a desativação das leveduras. A reação de fermentação, figura 13B, processou-se durante 22 horas. A fermentação foi acompanhada pela atenuação de sólidos solúveis, que finalmente atingiu 3°Bx.



Figura 13. Dorna de fermentação (A) e reação de fermentação (B)
Fonte: (AUTOR)

8.1.4 Destilação

Com o término da fermentação, separou-se o resíduo sólido (cascas, fibras e restos de leveduras) do vinho, utilizando um tecido de algodão como filtro, conforme mostra a figura 14A. Esse procedimento evita que os resíduos queimem no fundo do alambique e passe gosto desagradável à tiquira.

Para iniciar a destilação transferiu para um alambique simples de cobre (figura 14B) com capacidade para 30 litros de mosto fermentado, acoplado com termômetro, condensador e recipiente para recolhimento da tiquira, o volume de vinho resultante da fermentação e aqueceu de forma lenta e controlada durante todo o fluxo, evitando que o líquido entrasse em ebulição tumultuosa e tendo como consequência a turvação do destilado. A primeira fração destilada (*cabeça*), assim como o destilado fraco (*cauda*) foram desprezados, somente a parte nobre (*coração*) foi aproveitada. Durante o processo de destilação foi realizado o controle da graduação alcoólica com alcoômetro.

Finalmente após o processo de destilação da tiquira, o resíduo gerado, denominado de vinhaça ou tiborna foi colhido e descartado. Ver figura 14C.



Figura 14: Separação de resíduos sólidos após fermentação (A), destilação de aguardente obtida a partir de amido de mandioca (B) e resíduos após destilação (C)
Fonte: (AUTOR)

8.2 Produção de tiquira empregando fungos isolados

8.2.1 Gelificação/liquefação do amido da massa de mandioca

Inicialmente preparou-se um litro de solução de esporos na concentração de

$5,5 \times 10^7$ esporos/g amido e 1 litro de solução de sulfato de amônio a 10% m/v ($0,76 \text{ molL}^{-1}$).

Para o preparo do mosto, utilizou-se massa ralada, água potável (1:10 massa/água), solução de esporos (200 mL), sulfato de amônio (300 mL) e em seguida colocou-se em tacho de cobre. Fez a leitura do pH na suspensão que mediu 6,3 (faixa 6,0 a 8,0). Aqueceu-se lentamente com agitação constante até atingir 85°C para gelificar o amido e deixou-se em ebulição por 60 minutos, sem parar de agitar para liquefação. Testou-se com solução de Lugol e medidas de sólidos solúveis. Este procedimento pode ser visualizado na Figura 15A.

8.2.2 Sacarificação do amido da massa de mandioca

A suspensão foi resfriada a 30°C e acrescentado o restante da solução de esporos (800 mL) e sulfato de amônio (700 mL). Ajustou-se o pH para 5,0 (faixa 4 a 4,5), com ácido cítrico a 40% m/v ($2,08 \text{ molL}^{-1}$). Deixou-se em repouso por 96 horas para que houvesse a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. Fez acompanhamento de teste com Lugol e leitura dos sólidos solúveis. Ver Figura 15B.



Figura 15. Etapa de gelificação e liquefação (A) e sacarificação (B) do amido com solução de esporos de *Aspergillus niger*
Fonte: (AUTOR)

8.2.3 Fermentação alcoólica

O mosto obtido foi semeado com 1% de fermento usado em panificação, sobre o volume total do mosto. Ajustou-se o pH para faixa de 4,0 a 4,5. A fermentação foi conduzida em dorna de aço inoxidável com capacidade para 20

litros por 36 horas à temperatura de 30 °C (faixa 26 a 32°C). Durante o processo de fermentação foi realizado o acompanhamento do pH e medida de sólidos solúveis. A fermentação foi interrompida de acordo com o consumo dos sólidos solúveis durante o processo que atingiu finalmente 4 °Bx. Ver Figura 16.



Figura 16: Reação de Fermentação
Fonte: (AUTOR)

8.2.4 Destilação

Para o processo de destilação, foi utilizado alambique confeccionado de cobre acoplado com termômetro, condensador e recipiente para recolhimento da tiquira, com capacidade máxima para 30 litros. Antes da destilação, filtrou-se o vinho, utilizando-se tecido confeccionado de algodão como meio filtrante. Após este procedimento, adicionou-se o filtrado no alambique e aqueceu-se lentamente. Acompanhou-se a temperatura interna durante todo o processo. A primeira fração destilada (*cabeça*), assim como o destilado fraco (*cauda*) foram desprezados, somente a parte nobre (*coração*) foi aproveitada. O teor alcoólico foi medido por meio de um alcoômetro.

8.3 Análises físico-químicas

Nas tiquiras foram realizadas as seguintes análises químicas: açúcares, redutores, cobre, carbamato de etila, álcoois superiores, 1-butílico, 2-butílico, lactato de etila, teor alcoólico, acidez volátil, éster e metanol.

8.3.1 Açúcares redutores

Foi determinada a concentração de açúcares redutores (AR) nas amostras dos hidrolisados, no Laboratório de Tecnologia de Bebidas do Campus Maracanã do Instituto Federal do Maranhão. Utilizou-se a metodologia de Somogyi & Nelson⁶³. Este método baseia-se na redução estequiométrica do Cu^{2+} a Cu^{+1} , com formação de óxido cuproso (Cu_2O), o qual forma um complexo corado como o agente cromogênico enquanto o açúcar é oxidado a ácido orgânico. O Cu^{+1} é, então, complexado com o reativo de Nelson (arsenomolibdato) que tem um cromóforo, produzindo uma coloração azul cuja intensidade é proporcional à quantidade de açúcares redutores existentes. Foi empregada a seguinte técnica

Pipetou-se 1,0ml do material neutralizado com NaOH 1M e filtrou-se, transferindo-se para tubo de ensaio e acrescentando-se 1,0ml do reativo de Somogyi. Levou-se ao banho-maria fervente por 10 min. Foi retirado do banho e resfriou-se em água corrente. Acrescentou-se 1,0ml do reativo de Nelson e 7,0ml de água, agitou-se e fez-se a leitura no espectrofotômetro a 535nm.

O rendimento do processo é calculado sobre a quantidade usada de matéria-prima, mais comumente considerada a quantidade de amido que entrou no processo. É normal encontrar rendimentos acima de 100%. O fracionamento do amido em cadeias menores é acompanhado pela adição de uma molécula de água (hidrólise) em cada ligação rompida, o que acarreta aumento do peso de amido fracionado e consequentemente um aumento do rendimento. Por exemplo, no caso teórico de hidrólise total do amido em moléculas de glicose, 1 g de amido daria 1,1g de glicose, com rendimento de 110%.¹⁴

Para definir os valores de amido que se transformaria em glicose, foi assumida a seguinte conversão:

- Quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre à incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio. Estequiometricamente, cada mol de glicose produzida incorpora um mol de água.

- Considerando que:

1mol de glicose = 1mol de H_2O + massa de amido, então:

180,16g de glicose = 18g de água + 162,16g de amido ou

100g de amido teoricamente produz 111,1g de glicose.

Um hidrolisado com alto teor de glicose apresenta concentração de glicose de 94% em peso e dextrose equivalente de 96,28%, pode-se então calcular a concentração máxima de conversão a partir do amido.⁴³

O rendimento do processo de hidrólise foi definido como a porcentagem de amido que foi removido da mandioca e transformado em glicose. Considerando a utilização de um fator de conversão de 100%, assumir-se-á que “100,0 g de amido produzem 110,0 g de glicose”. A equação ficará definida como:

$$\text{Rendimento\%} = (\text{conc. Glicose no hidrolisado} / \text{conc. do amido} \times 0.342) \times 100.$$

O método utilizado para análise de glicose é eficiente em comparação a trabalhos já publicados utilizando o método como padrão. O maior problema encontrado é a necessidade de grandes diluições.

Determinando os teores de açúcares totais em alimentos por comparação entre o método colorimétrico e o título métrico (Somogyi-Nelson; Lane-Eynon; Fenol-Sulfúrico), chegaram à conclusão que tanto as amostras de concentrações conhecidas quanto em amostras de sucos de maçã e refrigerantes, os métodos utilizados não apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de significância. Portanto, qualquer dos métodos avaliados pode ser usado na quantificação de açúcares redutores e totais em alimentos, com a obtenção de resultados confiáveis e seguros.⁶⁵

8.3.2 Cobre

As análises de cobre presente nas tiquiras¹⁵ foram realizadas nos Laboratórios de Análises de solo da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, através de espectroscopia de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) utilizando um espectrômetro VARIAN modelo 720-ES.

Antes de serem analisadas por espectrometria de emissão atômica, todas as amostras de aguardentes tiveram que ser digeridas. Para tal digestão pegou-se 10 ml da amostra e adicionou-se 10 ml de ácido nítrico 10 N em um Erlemneyer, deixou-se por 12 horas em banho de água à temperatura ambiente. Em seguida levou-se a banho- maria a 80°C por 5 horas. Ao final transferiu-se para uma

proveta de 50 ml, completou-se o volume com água destilada e em seguida transferiu-se para uma garrafa de vidro de 50 ml para posterior análise. O processo de digestão corresponde à extração da fração de metais biologicamente disponível, é freqüentemente aplicada na obtenção de extrato para posterior quantificação de elementos químicos determinação por espectroscopia de absorção atômica ou outro método, como por exemplo, ICP-OES e ICP-MS que, para fins de leitura exigem a conversão de mostras sólidas ao estado de soluções. Normalmente uma grande gama de elementos, tais como: chumbo, zinco, manganês, cádmio, cobalto e cromo, dentre outros.⁶⁷

Consistindo numa poderosa ferramenta analítica para a quantificação de metais, semi- metais e não-metais em diversos tipos de amostras, a espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) utiliza uma fonte de plasma para produzir espectros de emissão a partir da excitação e decaimento de átomos e íons de interesse. Os ICP's de argônio são reconhecidamente as fontes de excitação mais utilizadas para análises multielementares seqüenciais ou simultâneas. Operando em temperaturas entre 7.000 e 15.000 K, o plasma apresenta energia suficiente para promover a excitação da maioria dos elementos químicos, proporcionando alta sensibilidade com ampla faixa linear de trabalho (0,1 a 1000 µg/mL) e estabilidade temporal satisfatória.⁶⁸

8.3.3 Carbamato de etila

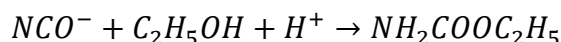
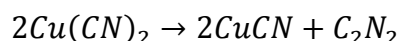
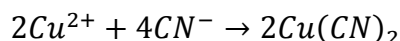
O carbamato de etila (Uretana), é o éster do ácido carbâmico, tem fórmula molecular $\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$, apresenta-se na forma de cristal incolor, tem ponto de fusão entre 48 e 50 °C, e ponto de ebulição entre 182 e 184 °C, com peso molecular de 89,09.⁷⁵ Em geral, o carbamato é produzido industrialmente a partir do fosfogênio, da ureia ou da cianamida. A principal forma de produção de carbamato de etila para fins comerciais é através da reação entre a ureia e o etanol.⁷⁰

O carbamato de etila é uma substância potencialmente carcinogênica encontrada em certas bebidas fermento-destilladas, nas quais se incluem a aguardente de cana e a tiquira. O Canadá foi o primeiro país a ter legislação específica sobre o assunto, tornando-se um referencial para os Estados Unidos e a União Europeia.⁷²⁻⁷⁴

A presença do carbamato de etila é comum em diversos alimentos e bebidas

onde ocorrem processos fermentativos, como os vinhos, iogurtes, queijos e cervejas. O mecanismo de formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas ainda não é bem compreendido. Estudos realizados atualmente com aguardentes tem como meta quantificar o carbamato de etila no produto e entender os seus mecanismos de formação.⁷²⁻⁷⁴

O precursor de maior importância para a formação do carbamato de etila em destilados é o íon cianeto CN^- . Este pode ser formado pela decomposição térmica ou enzimática de glicosídeos cianogênicos.⁷²⁻⁷⁴ Um dos mecanismos que envolvem a complexação do cianeto pelo Cu^{2+} , seguida pela oxidação a cianogênio e subsequente transformação a cianeto, estão demonstrados na Figura 5. O cianeto, por sua vez, pode reagir com o etanol e formar o carbamato de etila.^{72,73}



A análise das concentrações de CE nas tiquiras foi realizada no Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente (LDQA)-USP em São Carlos-SP, utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010, acoplado a um detector seletivo de massas Shimadzu GCMS-QP-2010, operando em modo SIM ($m/z = 62$).0. A separação cromatográfica foi efetuada em uma coluna capilar de fase polar, HP-FFAP, gradiente de temperatura: 90°C (2 minutos), taxa de aquecimento de 10°C/min até 150°C, outra taxa de aquecimento de 40°C/min até 220°C (2 minutos), temperatura: injetor (230°C) e detector (240°C), análise qualitativa: Tempo de retenção, monitoramento do íon m/z 62, e adições sucessivas do padrão, análise quantitativa: método de adição de padrão. As análises de carbamato de etila foram efetuadas seguindo metodologia descrita na literatura.⁷²

8.3.4 Álcoois superiores, 1-butílico, 2-butílico, lactato de etila e metanol

Durante a fermentação alcoólica, ocorre o desdobramento dos açúcares do mosto sacarificado com formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido

de carbono. Além desses, há, normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores.⁷⁶

A formação de álcoois superiores é maior quando o fermento apresenta atividade biológica fraca, ocasionando demora no processo fermentativo. Teores elevados de álcoois superiores totais têm origem nas condições em que se realizou o processo fermentativo, pois a presença em excesso de borras ao longo da fermentação alcoólica provoca um aumento de até 50% no teor de álcoois superiores, com exceção do álcool n-propílico que depende de outros fatores, como os descritos anteriormente. Outro fator relacionado com o teor destes compostos é um adequado processo de destilação, com a separação das frações denominadas de cabeça, coração e cauda.⁷⁶

As concentrações de Álcoois superiores, 1-butílico, 2-butílico, lactato de etila, ácido acético e metanol nas tiquiras, foram realizadas no Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente (LDQA)-USP em São Carlos-SP, utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC 17, detector de ionização de chama (FID), Coluna: HP- FFAP, comprimento de 60 m, diâmetro interno 0,22 mm, Gradiente de temperatura: 35°C (2 minutos), taxa de aquecimento de 10°C/min até 200°C, Temperatura: injetor (200°C) e detector (200°C), Análise qualitativa: Tempo de retenção, Análise quantitativa: método de adição de padrão.⁷⁷

O metanol presente na cachaça origina-se a partir do metabolismo secundário das leveduras que fazem a fermentação das bebidas alcoólicas. Na tiquira, ele é formado principalmente quando não se tem o cuidado de separar, por filtragem, os fragmentos da mandioca que se originam no momento da ralação ou passagem pela prensa.⁷⁵⁻⁷⁷

8.3.5 Teor alcoólico, acidez volátil e éster

Os ésteres, em geral, são formados durante a fermentação alcoólica graças às leveduras e bactérias. O acetato de etila corresponde a cerca de 80% do conteúdo total de ésteres da aguardente. Este éster é característico da fração cabeça do destilado e participa de forma negativa sobre sua qualidade final. Por isso, teores baixos destes compostos são sempre desejáveis em bebidas destiladas.

Por ser característico da fração cabeça, o acetato de etila, pode ter seu conteúdo controlado e ajustado pela técnica adequada de destilação, objetivando o recolhimento da fração ideal do destilado de coração. Além disso, o uso de levedura e substrato ideais, bem como um adequado monitoramento do tempo de fermentação, auxilia no controle de altas quantidades de ésteres.⁷⁷ O acetato de etila, principal éster encontrado nas aguardentes, é obtido pela reação entre pequenas quantidades de etanol e ácido acético, provenientes do processo de fermentação. Esse é responsável, quando presente em pequenas porções, pela incorporação de um aroma agradável de frutas na cachaça. Por outro lado, em grandes quantidades, confere à cachaça um sabor enjoativo e indesejado.⁷⁶

A acidez da aguardente depende do processo de fermentação, isto é, de fatores como: tipo da levedura, pureza da fermentação, tempo, temperatura e manejo do mosto.⁷⁷ Na presença de oxigênio e utilizando-se o levedo *Saccharomyces cerevisiae*, o açúcar pode ser convertido em ácido acético. Na ausência do mesmo, essa levedura produz apenas pequenas quantidades de ácido acético. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico são, frequentemente, associadas a práticas de estocagem e contaminações do mosto com bactérias acéticas, decorrente de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação.⁷⁷

A acidez volátil é um importante parâmetro correlacionado às características sensoriais de bebidas alcoólicas destiladas.⁷⁵⁻⁷⁷

As análises foram realizadas utilizando as metodologias sugeridas pelo Instituto Adolfo Lutz.⁶²

As amostras de tiquira foram analisadas quanto ao: teor alcoólico (% v/v) em densímetro digital a 20°C; pH em pH-metro digital; teor de acidez volátil (mg/100mL de álcool anidro) pelo método titulométrico com fenolftaleína como indicador; determinação de ésteres através da titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação (mg de acetato de etila por 100 em álcool anidro).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Gelificação/liquefação e sacarificação

Para a fase de gelificação nos processos propostos, constatou-se que as proporções entre massa ralada/água foram adequadas para essa etapa de processamento, pois, observou-se que a adição de um volume menor de água a viscosidade do mosto aumentava, ocorrendo o risco de queima durante o aquecimento. Não houve a necessidade de ajuste do pH na suspensão, pois os valores apresentados estão dentro da faixa de pH ótimo de atividade necessária, visto que o valor de pH para a mandioca *in natura* se encontra entre 6,0 a 8,0.

No processo com enzimas comerciais, a utilização das enzimas *Liquozyme Supra* e *AMG 300 L*, seção experimental, foram suficientes para obterem a liquefação e a sacarificação da massa de mandioca, respectivamente. A faixa de temperatura e o tempo utilizados para a liquefação do mosto da massa de mandioca gelificado foram ideais para essa etapa no processo utilizando a enzima *Liquozyme Supra*, uma endoenzima α -amilase, que atua na quebra das ligações α -1,4 de maneira aleatória formando dextrinas e unidades de glicose.¹³⁻¹⁵ Como resultado para essa enzima, observou-se que a suspensão apresentou coloração amarela com alguns grumos de amido em tom levemente azulado, diante o teste com Lugol, indicando conversão do amido em açúcares e a presença de dextrinas. Da mesma forma, com a utilização da segunda enzima, *AMG 300 L*, denominada amiloglucosidase, que é uma exoenzima, responsável pela quebra das ligações α -1,4 e α -1,6 a partir das extremidades não redutoras das dextrinas formadas a partir da quebra do amido pela α -amilase, as condições estabelecidas foram apropriadas para que ocorresse a sacarificação do mosto liquefeito¹⁻⁵. Com o término do processo, o mosto apresentou-se com coloração amarela na presença de solução de Lugol, indicando a presença de açúcares fermentescíveis. Verificou-se durante os procedimentos, que as enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglucosidase devem ser utilizadas em conjunto, pois uma potencializa a atividade hidrolítica da outra, ver figura 17.

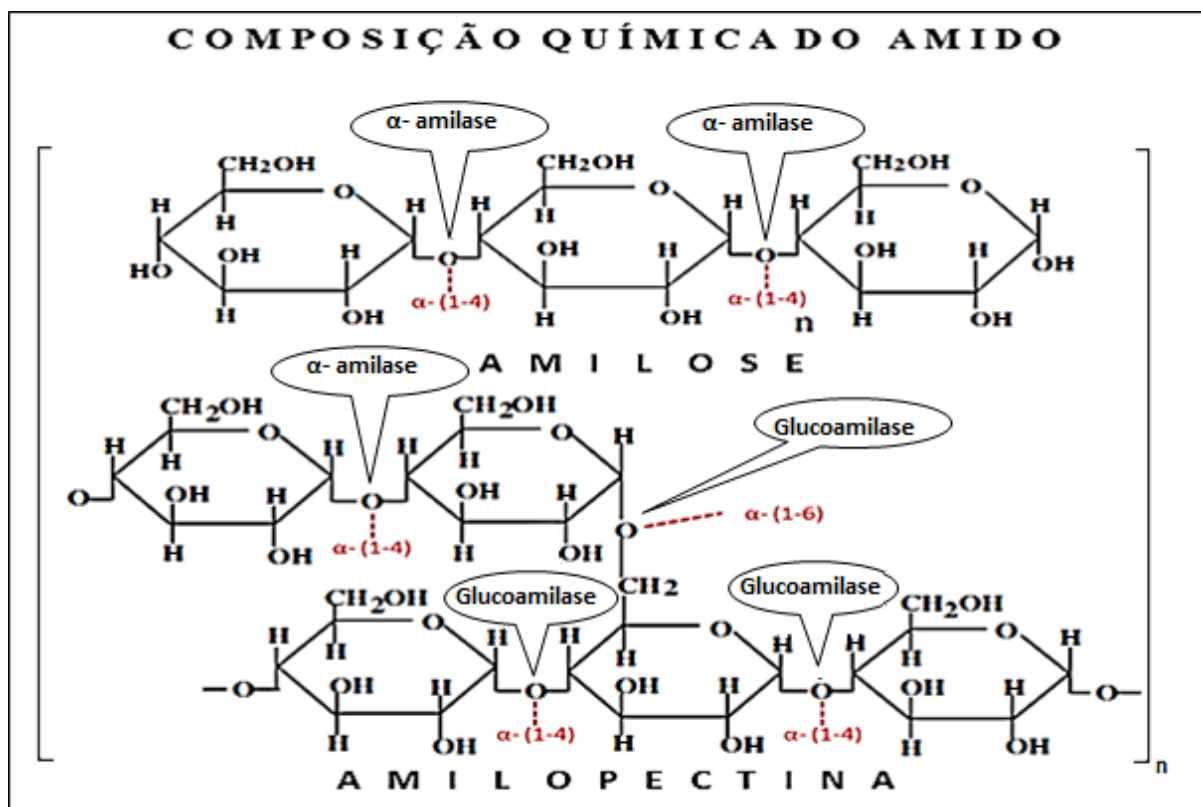


Figura 17. Ataque das enzimas amilase e amiloglicosidase
 Fonte: (AUTOR)

A quantidade de sólidos solúveis medida após a ação das enzimas no processo com enzimas comerciais variou entre 13 a 16 °Bx. De acordo com a literatura, esses valores podem ser considerados adequados para as enzimas empregadas. Pela análise das condições empregadas nessa etapa desse processo, observou-se que a conversão de amido em açúcares por hidrólise enzimática com as enzimas testadas foi expressiva para o processo proposto utilizando enzimas comerciais.

No processo com fungos isolados, diferentemente do processo com enzimas comerciais, foi necessária a suplementação com nitrogênio utilizando sulfato de amônio, que, é uma excelente fonte de nitrogênio para manutenção elevada da taxa de multiplicação celular pelos microorganismos,²⁴ tanto na gelificação, quanto na sacarificação, pois se observou que os microorganismos não cresciam o suficiente para metabolizar as enzimas necessárias para a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. As condições utilizadas na fase de gelificação foram suficientes para atingir a viscosidade e a liquefação do amido. O final do processo de sacarificação foi estabelecido pela reação com solução de Lugol que proporcionou coloração amarela na presença de açúcares. Embora o tempo de 96 horas

necessário para a conversão do amido em açúcares fermentáveis pelos fungos, tenha sido superior ao processo com enzimas comerciais, este se apresentou bastante expressivo em relação ao processo tradicional. Nas condições em que os experimentos foram realizados, a quantidade de sólidos solúveis medidos após a ação dos esporos variou entre 10 a 11 °Bx. De acordo com a literatura, os valores de sólidos solúveis indicados são considerados adequados para mosto amiláceos.¹³⁻¹⁵ Observou-se ainda, que os fungos isolados dos beijos do processo tradicional possuem um poder sacarificante desenvolvido pelas suas atividades enzimáticas, o que é evidenciado pelos resultados das análises de açúcar redutor do mosto sacarificado.

9.2 Fermentação alcoólica

Para o processo com enzimas comerciais, a fermentação foi acompanhada por 22 horas ao atingir um teor de sólidos solúveis equivalente a 3 °Bx, enquanto que, com fungos isolados, esta fase durou 36 horas e considerada encerrada quando o restante de sólidos solúveis atingiu 4 °Bx. Em ambos os processos, não foi necessário fazer qualquer suplementação durante esta etapa, pois as condições estabelecidas foram adequadas para assegurar uma boa fermentação alcoólica pelas leveduras. De acordo com a literatura, o tempo obtido de fermentação pode ser considerado normal para fermentado de mosto amiláceos.¹⁻³

9.3 Destilados

Com os experimentos utilizando enzimas comerciais, obteve-se um destilado com rendimento de 23,0% com graduação alcoólica de 40,2 °GL, enquanto que, com a utilização de fungos isolados, o rendimento no destilado apresentado foi de 19,5 % com graduação alcoólica de 38,2 °GL. Considerando-se que todas as etapas foram realizadas em laboratório, é válido ressaltar que os resultados foram satisfatórios para fabricação das tiquiras, visto que houve uma boa conversão do amido em açúcares.¹⁻³ Convém salientar que a tiquira é uma aguardente com graduação alcoólica de 36° a 54 °GL, conforme legislação vigente². Assim, tem-se que, analisando estes critérios as bebidas analisadas podem ser denominadas de aguardentes de mandioca.

Uma forma de aumentar a produção da tiquira de maneira competitiva, e levar esta nova tecnologia aos pequenos produtores é reduzir o tempo de processamento, o que foi realizado com a utilização de enzimas comerciais, fungos isolados e fermento biológico.²⁴ Os resultados demonstraram para os dois processos propostos que houve uma considerável redução de tempo com relação ao processo tradicional, ver figura 18.

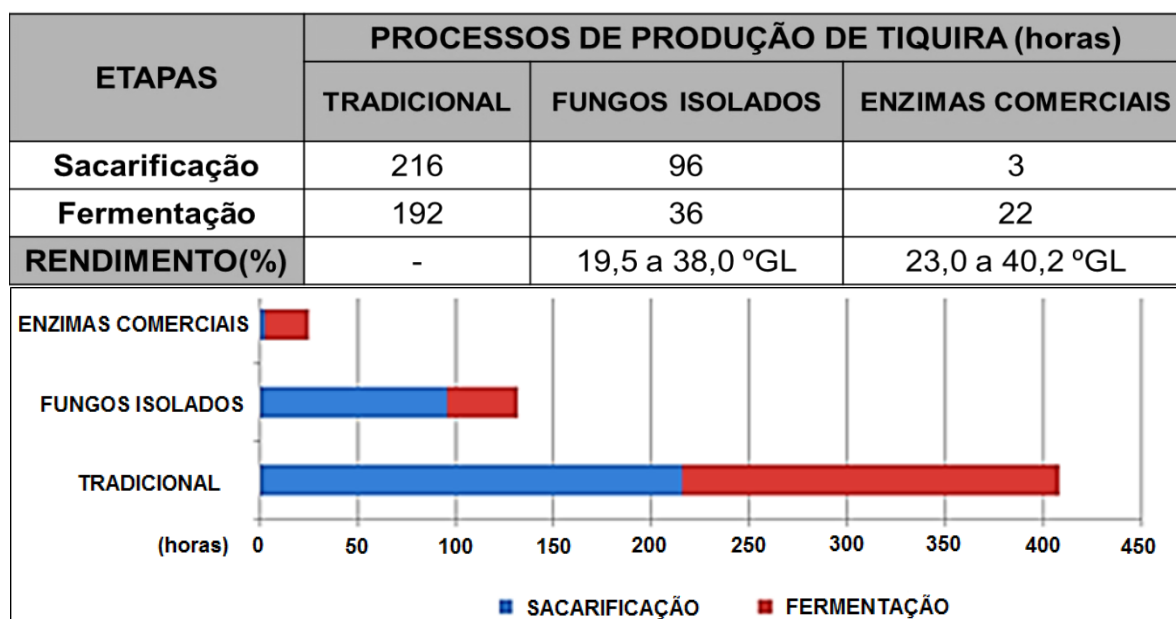


Figura 18. Eficiência dos processos de produção de tiquira
Fonte: (AUTOR)

9.4 Caracterização das tiquiras

Os resultados de rendimentos do processo de sacarificação obtidos pelos métodos usando enzimas comerciais e fungos isolados são demonstrados nas Tabelas 1, onde se observa que a conversão de amido em açúcares por hidrólise com as enzimas empregadas foi mais expressiva em relação à hidrólise com fungos isolados para as amostras analisadas, pois este processo apresentou-se mais eficaz com relação ao aumento do teor de açúcares no mosto, o que aumentou o substrato disponível para a fermentação alcoólica, obtendo-se maior produtividade de tiquira. De acordo com a literatura, pode-se considerar que os resultados encontrados neste trabalho mostram um ótimo rendimento de sacarificação quando se emprega enzimas comerciais.^{13,14} Já com o uso de fungos isolados, os valores estão ligeiramente abaixo dos valores encontrados na literatura.¹⁹⁻²²

Tabela 1. Rendimento dos processos de sacarificação e fermentação

Análises	Glicose (g L⁻¹)	Sacarificação (%)	Fermentação (%)
Mosto de massa de mandioca com enzimas comerciais, 500 g L ⁻¹ (3 ml kg ⁻¹)	140,0	81,8	23,0
Mosto de massa de mandioca com <i>Aspergillus niger</i> , 100g L ⁻¹ (5,5 x 10 ⁷)	24,7	72,2	19,5

Os resultados de análises para sólidos solúveis nos mostos dos processos com enzimas comerciais e com fungos isolados diante à hidrólise foram 16 e 11 °Bx, respectivamente. Com esses valores observou-se uma diferença significativa de 5 °Bx no teor de sólidos solúveis para tiquira com enzimas comerciais em relação à tiquira com fungos isolados após a sacarificação, o que evidencia, portanto, um aumento do teor de sólidos solúveis considerável, mediante a hidrólise com enzimas comerciais. Ver tabela 2.

Tabela 2. Sólidos solúveis nos processos após sacarificação dos mostos

Análises	Enzimas comerciais	Fungos isolados
Sólidos solúveis (°Bx)	16	11

Os resultados obtidos nas análises das tiquiras são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3. Caracterização das tiquiras produzidas com enzimas comerciais, fungos isolados e pelo método tradicional

Compostos	Enzimas Comerciais	Fungos Isolados	Método Tradicional	Referências
Teor alcoólico	40,2	38,2	47,6	36 a 54% (v. v ⁻¹) a 20 °C.
Acidez volátil	59,7*	32,4*	109,0*	Máx. 100*
Ésteres (em acetato de etila)	24,7*	28,4*	46,7*	Máx. 200*
1-butílico	< LD	< LD	-	-
2-butílico	< LD	< LD	-	-
Álcool n-propílico	151 ± 7,5	148 ± 7,4	-	-

Álcool isobutílico	670 ± 33,5	< LD	-	-
Álcool isoamílico	973 ± 9,7	1056 ± 52,8	-	-
Álcoois superiores (soma de n-propílico, isobutílico e isoamílico)	1794±50,7	1204± 42,3	-	Máx. 300*
Metanol	< LD	< LD	-	Máx. 20*
Lactato de etila	< LD	< LD	-	-
Cobre	0,9**	4,0**	9,2**	Máx. 5,0 **
Carbamato de etila	0,4**	0,9**	2,5**	Máx. 0,150 **

<LD = menor do que o limite de detecção (30 mg L⁻¹)

* mg 100 mL⁻¹ de Álcool Anidro.

** mg L⁻¹

Os valores obtidos para o grau alcoólico variaram entre 38,2 a 47,6 °GL, portanto, podendo ser definidas como aguardentes, conforme a legislação.⁵ Quanto aos teores de acidez volátil para as amostras de tiquira obtidas neste trabalho com enzimas comerciais, fungos isolados e produtores maranhenses foram 59,7; 32,4 e 109,0 mg/100 mL A.A, respectivamente. A ampla faixa de acidez volátil verificada nas aguardentes produzidas pelos produtores maranhenses pode ter ocorrido devido a que este parâmetro de qualidade está relacionado com vários fatores relacionados ao processo de fabricação, tais como: condições de higiene do ambiente e equipamentos, manejo do mosto e do vinho, tipo de levedura utilizada, controle do tempo e temperatura durante o processo fermentativo e a não separação adequada das frações cabeça e cauda do volume de tiquira destilado.¹⁻³

Os valores para ésteres em acetato de etila para tiquiras elaboradas nos processos propostos (24,7 e 28,4 mg/100 mL A.A.), embora condizentes com a legislação vigente, são considerados baixos. Isto deve-se à separação da fração cabeça (10%) na destilação, a qual contém a maior concentração de ésteres principalmente acetato de etila e outros compostos com baixo ponto de ebulição.²⁴⁻²⁶

Os resultados obtidos para álcoois superiores nas tiquiras produzidas sugerem que se tenha maior cuidado na fermentação. O alto teor de álcoois superiores verificado nas tiquiras produzidas com enzimas comerciais (1794 mg/100 mL A.A.) e fungos isolados (1204 mg/100 mL A.A.), pode ter ocorrido devido a influência da composição dos mostos, temperatura, nível de aeração e linhagem da levedura. Álcoois superiores, ésteres, aldeídos e ácidos orgânicos são os compostos responsáveis pelo aroma e sabor típicos de bebidas e desempenham um

importante papel na formação do perfil sensorial de destilados.^{24,25}

A figura 19 ilustra os resultados das análises químicas para o teor de cobre nas tiquiras (0,9; 4,0; 9,2 mg L⁻¹), que indicam que a tiquira proveniente de produtores maranhenses apresentou valor de concentração de cobre (9,2 mg L⁻¹), acima do limite permitido pela Legislação Brasileira atual,⁵ enquanto que, as produzidas pelos processos propostos, os quais empregam enzimas comerciais (0,9 mg mL⁻¹) e fungos isolados (4,0 mg L⁻¹), os valores obtidos estão abaixo do aceitável, 5mg L⁻¹. A elevada concentração de acidez volátil dessas amostras pode ter favorecido a sua contaminação por cobre, uma vez que o sal de cobre [CuCO₃Cu(OH)₂] é mais solúvel em meio ácido.⁷ Esses resultados indicam falta de higienização do destilador necessária para a remoção do azinhavre (carbonato básico de cobre), formado e arrastado pelos vapores ácidos e alcoólicos da aguardente no momento da destilação. O cobre presente nas aguardentes é proveniente da dissolução desse sal que se forma no interior do alambique e principalmente nas partes internas da serpentina utilizadas para resfriamento do destilado.^{7,8} Embora, a presença desse metal, na aguardente, possa ser prejudicial à saúde dos consumidores, a utilização de alambiques de cobre na produção de tiquira e a consequente presença desse metal em pequenas quantidades na bebida é importante para que a aguardente tenha uma boa qualidade sensorial.¹⁻³ O cobre atua como catalisador de algumas reações, reduzindo o teor de compostos sulfurados, aldeídos e a acidez, que conferem ao produto destilado sabor e odor desagradáveis.^{7,8} Os elevados valores das concentrações de cobre das amostras produzidas por produtores maranhenses indicam a necessidade de orientar os produtores artesanais sobre a importância e a forma correta de higienização do destilador, assim como a de incorporar uma nova metodologia de produção da tiquira de fácil manipulação com o objetivo de otimizar o processo.

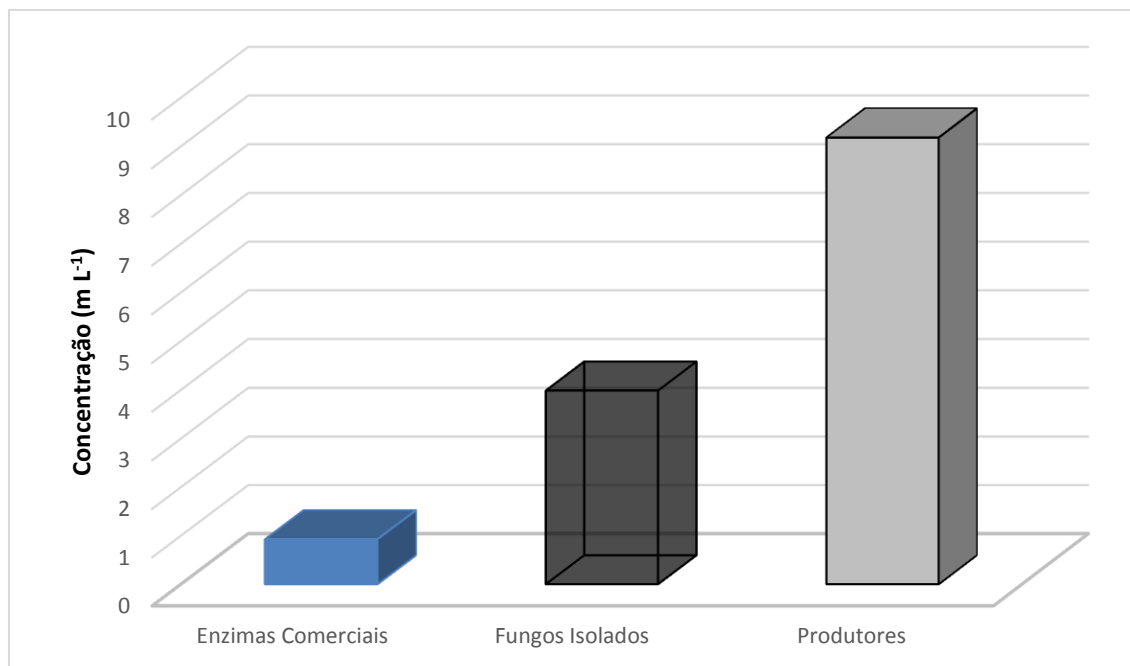


Figura 19. Concentração de cobre nas tiquiras

A figura 20 mostra os resultados obtidos para a quantificação do carbamato de etila ou Uretana ($C_2H_5COONH_2$), nas tiquiras produzidas pelos processos propostos e método tradicional. Embora as amostras das tiquira produzidas terem apresentado teor de carbamato de etila alto em relação a especificação ($0,150 \text{ mg L}^{-1}$), estes valores demonstram concentrações deste composto bastantes inferiores ao processo tradicional. A complexidade da concentração desta substancia em bebidas propicia uma série de diferentes vias para sua formação, pois depende da matéria-prima utilizada no processo, condições de fermentação, destilação³¹ e armazenamento. Atualmente, estão em curso de investigações para se determinar os fatores responsáveis pelo alto teor de carbamato de etila nas cachaças e nas tiquiras. O mecanismo de formação deste composto em alimentos e bebidas ainda não está totalmente esclarecido.³¹⁻³³

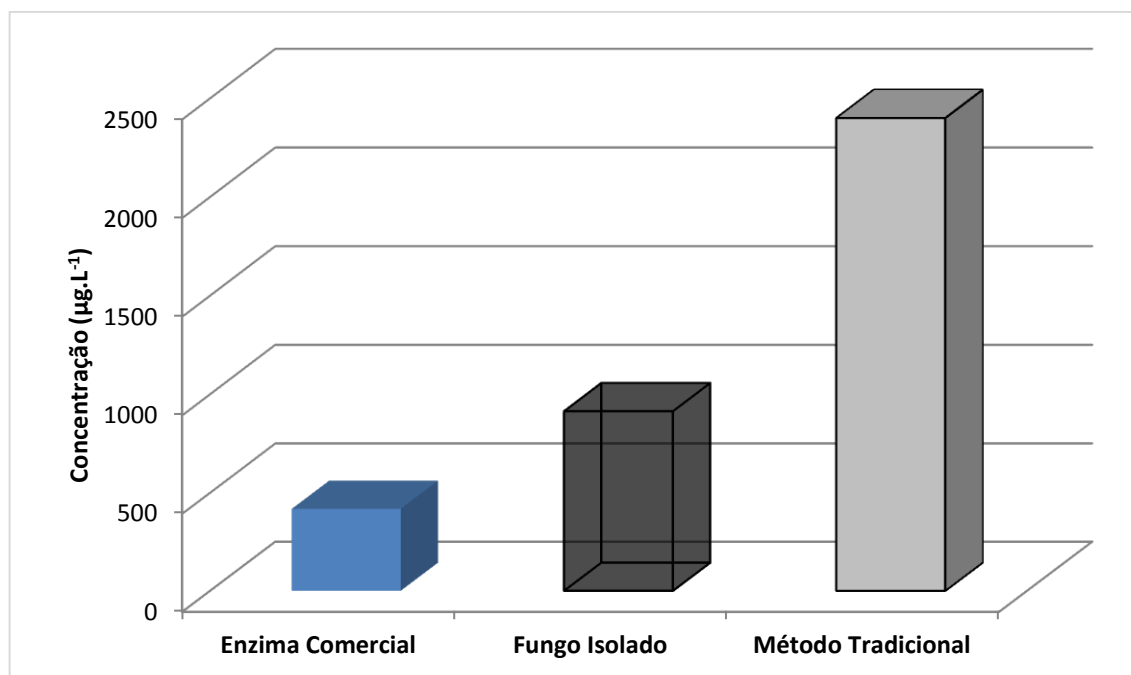


Figura 20. Concentração de carbamato de etila nas tiquiras

10 CONCLUSÕES

Com a substituição dos bolores por enzimas comerciais nas circunstâncias propostas, a liquefação e sacarificação completaram-se em 60 e 120 minutos respectivamente, nesse caso, a fabricação da tiquira incluindo a fermentação e a destilação, poderá ser realizada em apenas 25 horas, enquanto que para o método adotando fungos isolados, o tempo de produção da aguardente foi equivalente a 136 horas, evidenciando assim para os dois processos propostos uma considerável redução de tempo com relação ao processo tradicional, que leva em média 20 dias para a consecução do destilado. Nas alterações efetuadas não se fez o uso de produtos para estabilizar enzimas, porém, para os fungos isolados houve necessidade.

Os dados obtidos indicaram que há grande semelhança entre a qualidade físico-química das aguardentes elaboradas a partir da massa de mandioca com o uso de enzimas comerciais e fungos isolados. Os processos de fermentação e destilação do mosto oriundos da hidrólise da massa de mandioca são equivalentes ao da cana-de-açúcar, por isso, podem ser executados com facilidade por pequenos produtores, utilizando os mesmos equipamentos. A hidrólise enzimática da massa de mandioca aumentou as quantidades de açúcares redutores e sólidos solúveis nas situações avaliadas.

Há que se ressaltar também que as altas concentrações de cobre e carbamato de etila identificadas no processo clássico, comprometem a qualidade da bebida e representam riscos à saúde dos consumidores. Então, nas condições as quais os experimentos foram realizados, os resultados deste trabalho indicaram que a substituição do processo tradicional por enzimas comerciais, fungos isolados e levedura prensada é tecnicamente viável, portanto, recomendável aos pequenos produtores, principalmente. A otimização do processo da tiquira permitirá resgatá-la da sua forma primitiva e demorada de fabricação, e possivelmente da extinção tendo em vista que hoje a sua produção se deve a alguns pequenos produtores, e em especial no Estado do Maranhão.

11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realizar uma análise preliminar do custo de produção das enzimas α -amilase e amiloglicosidase;
- ✓ Estudar a adição de corantes alimentícios adequados em substituição do cristal violeta sem riscos ao consumidor e sem alterar a qualidade sensorial e visual do produto;
- ✓ Estudo da seleção de matéria prima com menor teor de glicosídeos cianogênicos.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VENTURINI FILHO, W.G.; MENDES, B. do P. **Fermentação alcoólica de raízes tropicais**. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Cord.). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, cap. 19, 2003.p. 530-575.
2. VENTURINI FILHO, W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, cap. 21, p.525-550, 2005.
3. 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.
4. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Complementação dos padrões de identidade e qualidade para destilados alcoólicos**. Decreto nº 2.314.
5. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para tiquira, 24 de abril de 2008**. Diário Oficial da União, Brasília, 2008, p.17.
6. SANTOS, G.S.; MARQUES, E.P.; SILVA, H.A.; BEZERRA, C.W.B.; MARQUES, A.B. **Identificação e Quantificação do Cristal Violeta em Aguardentes de Mandioca (Tiquira)**. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 4, 583-586, 2005.
7. NETO, B.S.L.; BEZERRA, C.W.B.; POLASTRO, L.R.; CAMPOS, P.; NASCIMENTO, R.F.; FURUYA, S.M.B.; FRANCO, W.D. **O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle**. *Química nova*, 1994, vol. 17, nº 3.
8. NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; FARIA, J. B. **Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar**. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p.735-739, 1998.
9. BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardentes de cana: ocorrência e quantificação**. 2001. 100f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, USP, 2001.

10. ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; MARQUES, E. P.; FRANCO, D. W. **Carbamato de Etila em Bebidas Alcoólicas (Cachaça, Tiquira, Uísque e Grapa)**. Quim. Nova, Vol. 25, N°. 6B, 1074-1077, 2002.
11. GALINARO, C. A.; FRANCO, D.W. **Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas**. Quim. Nova, Vol. 34, N° 6, 996-1000, 2011.
12. CHISTÉ, R. C. et al. **Qualidade da Farinha de mandioca do grupo seca**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 4, p. 861-864, 2006.
13. MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agro nômicaCeres,1980.
14. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 3ª. Ed. Varela, 2003, São Paulo.
15. ARAÚJO FILHO, A. A. **Obtenção de álcool anidro a partir da mandioca: possibilidades no nordeste**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1976. 86p.
16. Cardoso, M. G.; **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**, Ed. UFPA: Lavras, 2006.
17. RIBEIRO, D.M.L. **Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (tiquira)**. Dissertação de Mestrado em Química. UFPA, 2011.79f.
18. PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a Partir do Bagaço de Mandioca**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPA, 2002. 81p.
19. CEREDA, M. P. **Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v.1,2,3,4.
20. SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzima e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFV, 2007. 104p.
21. SILVA, M. J. Cultura da Mandioca In: SILVA, M. J. da (Org.); **Métodos e culturas alternativas na agricultura familiar**; Campo Grande: UCDB, 2003, p. 13-54.
22. SWINKELS, J. J. M. **Composition and properties of commercial native starches**. Starche/ Starke, v.37, n.1, p. 1-5, 1985.

23. TAPARELLI, J. R. **Modificação Química do Amido de Mandioca e Estudo de sua Aplicação em Revestimento de Couché**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais. Campinas, São Paulo, 2005.
24. BANKS, W., GREENWOOD, C.T., KHAN, K.M. **The interaction of linear, amylose ligomers with iodine**. *Carbohydrate Research*, v. 17, p. 25-32, 1971.
25. MUA, J.P., JACKSON, D.S. **Relationships between functional attributes and molecular structure of amylose and amylopectin fractions from corn starch**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, p.3848-3854, 1997.
26. SPIER, M.R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α - Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFP, 2005. 157p.
27. LIMA, U.A. *Aguardentes*. In: AQUARONE, E., LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 5. p. 145-182.
28. NEVES, V.J.M. **Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo, 2004.
29. BILIADERIS, C. G. **The structure and interactions of starch with food**. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 69, p. 60-78, 1991.
30. MORRISON, W. R. **Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality**. *Cereal Foods World*, v. 40, p. 437-446, 1995.
31. CARIOCA, J.O. B.; ARORA, H.L. **Biomassa: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1984.p. 49-331.
32. VASATHAN, T.; BATTHY, S. **Enhancement of resistant starch (RS3) in amylomaize, barley, field pea and lentil starches**. *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 50, n. 7, p. 286-291, 1998.
33. CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 80-82.
34. TROVATI, J.; GIORDANO, R.L.C. **Produção de Etanol a Partir de Amido Utilizando Amiloglucosidase e Levedura Coimobilizadas em Gel de Pectina**. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química/ UFSCar.

35. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª.Ed. Simões AA, Lodi WRN. São Paulo: Sarvier. p 570-585.1995.
36. HAGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das fermentações, 1982. 52p.
37. AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos**. Vol. 3. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo – SP, Brasil 2001. 595p.
38. HIZUKURI, S. 1996. **Starch: analytical aspects**. In: Eliasson, A.-C., Editor, 1996. Carbohydrates in Food. Marcel Dekker, New York, pp. 347–429.
39. CONN, E.E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447p.
40. FUJJI, M.; HOMMA, T.; TANIGUCHI, M. **Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules**. Biotechnol Bioeng. v.32, p. 910-915, 1988.
41. SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***, 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa – PR. 2006. 81p.
42. ZANIN, G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglucosidase Imobilizada**. Campinas, Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. FEA, UNICAMP, 1989.
43. PELCZAR. **Microbiologia-Conceitos e Aplicações**. Cap. 10. 4. Ed. São Paulo: Makron Books, 1998. P. 258-271.
44. TEIXEIRA, M. F. S.; MATSUURA, A. B. J.; SOARES, C. S. S. S. **Micologia Médica- Manual de Laboratório**. Manaus: UFAM, 111p., 1999.
45. ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo, Manole Ltda. 1988. 186 p.
46. TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª Ed. Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2002.
47. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier, 2002.
48. CARVALHO, S.M.S. **Análise das Enzimas Amilolíticas Produzidas por Micro-organismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, Dissertação de

- Mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, 1999.
49. NEDER, R.N. **Microbiologia. Manual de laboratório**. São Paulo, Nobel S.A., 1992.p.46-54.
 50. ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.
 51. WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza, Acribia, 1995. 228p.
 52. JA'AFURU, M. I.; FAGADE, O. E. **Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger***. Research Journal of Biological Science, 2(1), p. 13-16, 2007.
 53. CARTA, F. S. **Hidrólise enzimática dos resíduos de fecularias e produção de ácido fumárico por fermentação de fungos do gênero *Rhizopus***. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 88f. 1999.
 54. SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. cap. 2, p. 25-9.
 55. SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. cap. 2, p. 25-9.
 56. SIQUEIRA, R.S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Brasília, EMBRAPA-SPI, 1995, cap. 2, p. 19-24.
 57. PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2ª ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605p.
 58. BOGUSZ JÚNIOR, S. et al. **Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil**. Ciênc. Tecnol. Alim. Campinas, v. 26, p. 793-798, 2006.
 59. ALVES, J. G. L. et al. **Desenvolvimento, avaliação qualitativa, rendimento e custo de produção de aguardente de goiaba**. Braz. J. Food Technol. v. 11,p. 64-68, 2008.
 60. BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. e YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3ed. Cambridge, U.K.; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000. IX, 1139 p. p.

61. GUEDS, L. S.; FACCIOTTI, M. C. R.; ABOUTBOUL, H.; SCHNIDELL, W. FARIA, J. B; SCHENBERG, A. C. G. **Síntese de Glucoamilase por levedura geneticamente modificada visando a produção de etanol a partir de material amiláceo**. Ciência e cultura, São Paulo. V. 2, p. 1183-1188, 1984.
62. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo: IMESP, 2005. v. 1: **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 1020 p.
63. SOMOGYI, M.A. **A New Reagent for the Determination of Sugars**. J. biol. Chem. 160p. 61-68. 1945.
64. SOCCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDEBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005.p. 221-230.
65. SOCCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEALT, J.M. **Breeding and Growth of Rhizopus in Raw cassava By Solid State Fermentation**. Applied Microbiology and Biotechnology. v.41. 1994. P.330-336.
66. ORIOL, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur milieu solid: importance de l'eau de l'activité de l'ea**, 113f. Thèse (Doctorat) Microbiologie, INSA Toulouse, 1987.
67. DEMIATE, I.V.; WOSLACK, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. **Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos**. Comparação Entre Método Colorimétrico e Titulométrico. Engenharia de Alimentos, UEPG, p.65-78, 2002.
68. DEMIATE, I.V.; WOSLACK, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. **Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos**. Comparação Entre Método Colorimétrico e Titulométrico. Engenharia de Alimentos, UEPG, p.65-78, 2002.
69. ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Cooper (II) **catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.
70. ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; MARQUES, E. P.; FRANCO, D. W. **Carbamato de Etila em Bebidas Alcoólicas (Cachaça, Tiquira, Uísque e Grapa)**. Quim. Nova, Vol. 25, N°. 6B, 1074-1077, 2002.

71. ALMEIDA, L.U.; TEIXEIRA, C. G.; BERTOZZI, J. C.; SERAFIM, F. A. T.; ALCARDE, A. R. **Influence of fast and slow distillation on ethyl carbamate content.**
72. GALINARO, C. A.; FRANCO, D.W. **Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas.** *Quim. Nova*, Vol. 34, N° 6, 996-1000, 2011.
73. Odello, L.; Braceschi, G. P.; Seixas, F. R. F.; Silva, A. A.; Galinaro, C. A.; Franco, D. W. **Avaliação sensorial da cachaça.** *Quim. Nova* 2009, 32, 1844.
74. BOSCOLO, M.; BEZERRA, C.W.; CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D.W. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 2000, v.11, n. 1, p. 86.
75. MAIA, A. B. R. A. *et al.* **Fermentação alcoólica semi-contínua destinada a produção de aguardente.** *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tec. Alim. Campinas*. v. 25. n. 1. p. 33-36.1991.
76. BOZA, Y.; HORII, J. **Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar.** *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. v. 18, n. 4, p. 391-396, 1998.
77. COELHO, T. **Alimentos: Propriedades Físico-Químicas.** 2ª ed. Rio de Janeiro: cultura médica, 2002. P. 44-45.

ANEXO 1 – Cálculo da contagem de esporos usando a câmara de Neubauer

Considerando-se que a câmara de Neubauer contém 25 quadrículos. Entre a câmara e a lamínula, forma-se um filme líquido da diluição preparada de 0,1mm de espessura. A dimensão de cada quadrículo é de 0,2mm x 0,2mm. Portanto, em cada quadrículo temos o volume de 4×10^{-6} ml:

Equivalências:	1 ml	1 cm^3
	1 ml	1000 mm^3
	X ml	$0,004 \text{ mm}^3$
	$X = 0,004 \text{ mm}^3$	4×10^{-6}
	1000 mm^3	1 ml

Portanto, em um quadrículo temos 4×10^{-6} ml

ANEXO 2 – Preparo das soluções de Somogyi-Nelson

Reativo de Somogyi: Pesou-se 28g de NaHPO_4 e adicionou-se 40g de tartarato duplo de sódio e potássio em 700ml de água. Adicionou-se 100 ml de NaOH 1N. Gotejou-se 80 ml de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 10%, sob agitação constante. Juntou-se 180g de Na_2SO_4 e completou-se o volume com água a 1000 ml. Deixou-se em repouso por dois dias e filtrou-se em papel qualitativo, guardando o reativo em frasco escuro a 37°C .

Reativo de Nelson: Pesou-se 50g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e dissolveu-se em 800ml de água. Adicionou-se 52 ml de H_2SO_4 concentrado. Juntou-se 6g de hidrogênio arseniato de sódio dissolvidos em 50 ml de água. Completou-se o volume a 1000 ml. Deixando em frasco escuro por dois dias e conservando a 37°C .