



**Universidade de Brasília**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E  
TECNOLOGIAS EM SAÚDE**

**IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA**

**TRANSFORMAÇÃO DA BIOMASSA DA MANDIOCA  
PELO *Aspergillus oryzae***

**Brasília**

**2016**

**CATALOGAÇÃO BIBLIOGRÁFICA OBEDECENDO ÀS  
NORMAS DA BIBLIOTECA CENTRAL DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
UnB**

# **TRANSFORMAÇÃO DA BIOMASSA DA MANDIOCA PELO *Aspergillus oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília para obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

Co-orientadora: Daniela Castilho Orsi

Área de Concentração: Mecanismos Básicos e Processos Biológicos em Saúde

Linha de Pesquisa: Nanobiotecnologia Aplicada à Saúde

**Brasília**

**2016**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias  
em Saúde da Universidade de Brasília**

**Aluno: Igor Albuquerque de Souza**

**Orientador (a): Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

**Membros titulares:**

**1. Profa. Claire Nain Lunardi Gomes (Presidente) - UnB**

**2. Prof. Dr. Vinicius Ricardo de Souza - IESB**

**3. Prof. Dr. Anderson Gomes de Jesus - UnB**

**Membro suplente:**

**4. Prof. Dr. Araken dos Santos Werneck Rodrigues (Suplente) -  
UnB**

**Data: 07/12/2016**

***“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é  
perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que  
estão certas”. (Carl Sagan)***

## **Agradecimentos**

*Gostaria de agradecer a todo o grupo de pesquisa tanto do Laboratório de Fotoquímica, quanto do Laboratório do Controle de Qualidade.*

*A todo o corpo técnico da instituição que sempre foram solícitos e pacientes com minhas demandas.*

*Agradecer a minhas duas orientadoras Claire Nain Lunardi Gomes e Daniela Castilho Orsi, que me guiaram pelo melhor caminho possível.*

*A todos os professores da instituição, em especial o professor Paulo Gustavo Barboni pelas diversas consultorias.*

*Agradecer a minha família e amigos que em meus dias de ausência me compreenderam.*

*A Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF)*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Apoio à*

*Pesquisa a Novos Docentes do Decanato de Pesquisa e Pós-graduação DPP- UnB, por terem financiado este estudo.*

*Aos membros da banca examinadora que aceitaram participar e contribuir para as melhorias deste trabalho.*

*À Secretaria da Pós-graduação pelo empenho nas atividades prestadas.*

*A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a elaboração desta dissertação.*

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1.1.	Bebidas alcoólicas.....	2
1.2.	Hidrólise de matérias primas amiláceas.....	5
1.3.	Destilados Nacionais: cachaça e tiquira.....	7
1.4.	Congêneres e análises de bebidas alcoólicas destiladas.....	12
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivo geral.....	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	MÉTODOS.....	17
3.1.	Cultivo do <i>Aspergillus oryzae</i> em arroz para obtenção de suspensão fúngica.....	17
3.2.	Preparo da matéria-prima.....	17
3.3.	Processo de hidrólise enzimática dupla (liquefação e sacarificação) do amido da mandioca.....	17
3.4.	Fermentação alcoólica.....	18
3.5.	Análises do destilado de mandioca.....	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1.	Artigo publicado.....	20
4.2.	Resumo a ser publicado.....	28
5.	CONCLUSÃO.....	37
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	39
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8.	ANEXOS.....	45
	ANEXO I.....	45
	ANEXO II.....	46
	ANEXO III.....	47
	ANEXO IV.....	48
	ANEXO V.....	49
	ANEXO VI.....	Erro! Indicador não definido.

## TABELAS

Tabela 1: Análises do mosto, do fermentado alcoólico e do destilado de mandioca .....	32
Tabela 2 Análises da fração coração do destilado de mandioca por CG/FID.....	34

## FIGURAS

Figura 1: Registro do processo de fabricação de vinho no antigo Egito .....	3
Figura 2: Registro de ilustração Árabe do processo de destilação.....	3
Figura 3: Estruturas moleculares das enzimas alfa amilase de <i>Aspergillus oryzae</i> e amiloglicosidase de <i>Aspergillus niger</i> .....	6
Figura 4: Moagem da cana de açúcar nos engenhos do nordeste do Brasil	
Figura 5: Raiz de mandioca, <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	8
Figura 6: Estrutura do amido, apresentando estrutura da amilose (polímero linear composto por D- glicoses unidas em $\alpha$ (1-4) e estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D- glicoses unidas em $\alpha$ (1-4) e $\alpha$ (1-6) .....	10
Figura 7: Beijus utilizados no processo de fabricação de tiquira. ....	11
Figura 8: Tiquira comercializada no Maranhão.....	12



Keywords: cassava, spirit, distillate, *Aspergillus oryzae*, amylases

### Abstract

The cassava spirit, known as *tiquira*, is produced mainly in the north region of Brazil and it is regulated by Brazilian legislation. This study aimed to evaluate the traditional method of cassava spirit production, using a controlled process with application of fermentation technology in a laboratory scale production. *Aspergillus oryzae* was used for liquefaction and saccharification of cassava starch by direct incubation and fungal suspension, adding amiloglucosidase from *Aspergillus niger*. It was obtained wort with 13.03 °Brix and 6.80% of reducing sugars, in incubation method, 9,96 °Brix and 8,17 % of reducing sugars, in method of fungal suspension. Commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used for alcoholic fermentation. After alcoholic fermentation, it was obtained fermented wort with very low volatile acidity. The cassava spirit was obtained by a double distillation process, with separation of the fractions head, heart and tail. The heart fraction of the distillate showed alcohol content of 51.56°GL. The contents of aldehydes, esters, methanol and higher alcohols (n-propyl, isobutyl and isoamyl) were determined in cassava spirit using gas chromatography. According to the results, the cassava spirit showed methanol and higher alcohols contents above the limits imposed by Brazilian legislation.

### Resumo

O destilado da mandioca, conhecido como tiquira, é produzido principalmente na região norte do Brasil e é regulamentado pela legislação brasileira. O objetivo deste trabalho foi avaliar o método tradicional de produção de aguardente de mandioca, utilizando um processo controlado com aplicação de tecnologia de fermentação em produção em escala laboratorial. *Aspergillus oryzae* foi utilizado para liquefação e sacarificação de amido de mandioca. Foi obtido um mosto com 13,03 ° Brix e 6,80% de açúcares redutores. A levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada para a fermentação alcoólica. Após a fermentação alcoólica, obteve-se mosto fermentado com acidez volátil muito baixa. O espírito de mandioca foi obtido por destilação dupla, com separação das frações cabeça, coração e cauda. A fração coração do destilado apresentou teor de álcool de 51,56°GL, no primeiro método, e 48,10 °GL no segundo método. Os teores de aldeídos, ésteres, metanol e álcoois superiores (n-propilo, isobutilo e isoamilo) foram determinados em espuma de mandioca usando cromatografia gasosa. De acordo com os resultados, a cultura da mandioca mostrou teor de metanol e alcoóis superiores aos limites impostos pela legislação brasileira.

Palavras – Chave: mandioca, destilado, *Aspergillus oryzae*, amilases

# INTRODUÇÃO GERAL

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

Todas as sociedades usam substâncias que alteram a percepção da realidade, a quantidade e a qualidade da consciência, em ocasiões sagradas e profanas. A história das drogas é tão longa quanto a da humanidade, se desenvolvendo paralelamente, seu uso específico de quem tem intenção de querer experimentar com consciência. Usos e costumes se modificaram ao longo do tempo, mas as substâncias psicoativas continuam fazendo parte da vida dos povos, em todos os países e em todos os tempos. A aceitação cultural do uso dessas substâncias foi sendo construída ao longo dos séculos <sup>1</sup>.

Bebidas alcoólicas são substâncias psicoativas como tantas outras. A diferença do álcool, em relação as diversas substâncias entorpecentes, se dá pelo fato de que a bebida, hoje tem sua produção, comércio e uso permitidos por lei, o que a torna extremamente acessível, mas em algumas épocas e sociedades a produção e comercialização de bebidas alcoólicas já foram ou ainda são proibidas. O álcool é a droga de maior consumo no mundo, nas mais diferentes culturas, podendo-se dizer que o consumo de substâncias que possuem a capacidade de alterar o estado mental e modificar o comportamento humano, parecendo ser um fenômeno universal <sup>1</sup>.

### **1.1. Bebidas alcoólicas**

As primeiras bebidas consumidas pela humanidade eram advindas de mel e frutas. Há registros de barris de cerveja, datados aproximadamente do final da idade da pedra, 8000 A.C. anos, dando indícios que a humanidade vinha fermentando bebidas alcoólicas a pelo menos 10.000 anos. A fermentação de vinho aparentemente ocorreu depois (Figura 1). Resíduos de jarros achados no Iran, datando de 5400 – 5000 A.C. indicam que alguma vez contiveram vinho <sup>2</sup>.

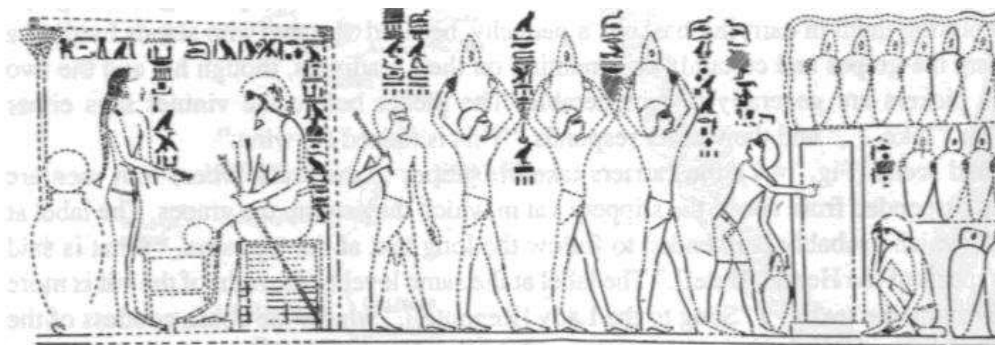


Figura1: Registro do processo de fabricação de vinho no antigo Egito

Fonte: <http://www.arabworldbooks.com/egyptomania/wine.htm>

Acredita-se que a arte da destilação era sabida aos gregos de Alexandria antes da abertura da era cristã e usada mais tarde pelos árabes para a obtenção de óleos essenciais (Figura 2), mas que a destilação de álcool só se desenvolveu na Europa Ocidental a partir do século XII D.C. <sup>3</sup> Alberto Magnus (1193-1280) foi a primeira pessoa a descrever claramente o processo onde bebidas destiladas poderiam ser produzidas <sup>2</sup>.



Figura 2: Registro de ilustração Árabe do processo de destilação

Fonte: <http://www.bottleneckmgmt.com/blog/wp-content/uploads/early-distillation.jpg>

Médicos, monges e outros profissionais, aos poucos se interessaram pelo processo de destilação de álcool para uso como remédio, antes do produto alcoólico ser produzido para fins recreativos e outros propósitos <sup>4</sup>. A destilação fez a migração da

Europa continental para a Escócia e para a Irlanda através de monges itinerantes. Os mosteiros escoceses e irlandeses, durante escassez de videiras e uvas do continente, passavam a utilizar um cereal fermentado para produzir álcool, resultando nas primeiras destilações do uísque moderno <sup>5</sup>.

Por volta dessa época, os primeiros registros de destilação de álcool aparecem na Itália, sendo destilados a partir do vinho. A técnica foi relatada por Ramon Llull (1232 - 1315). O primeiro registro escrito de "uísque" aparece nos Anais irlandeses de Clonmacnoise, onde está escrito que o chefe de um clã morreu depois de "tomar um excesso [quantidade excessiva] de aqua vitae" no Natal <sup>4</sup>.

Com a evolução do processo e maior domínio na tecnologia de fermentação, o uísque é a bebida destilada mais antiga que está perpetuada atualmente pelo mundo. O uísque tradicionalmente é feito a partir do mosto de grãos triturados (incluindo algum malte que contém enzimas amilolíticas para quebrar os amidos dos grãos em açúcares e água quente a partir da qual se origina um extrato líquido chamado de mosto). O mosto é fermentado, se assemelhando a uma cerveja simples, sem lúpulo, chamada de lavagem que é então destilada e envelhecida <sup>6</sup>.

Um destilado que possui um contraste nítido no seu método de preparo em relação a outros destilados é a *vodka*. A maioria das *vodkas*, particularmente a *vodka* da América do Norte, é feita a partir de álcool puro, ou seja, álcool de que toda a cabeça (primeira fração da destilação) e toda cauda (última fração da destilação) foram removidas. O órgão regulador dos Estados Unidos, *Alcohol, Tobacco & Firearms* (ATF), define a *vodka* como "Um destilado neutro e multiplamente destilado que não possui caráter distintivo, aroma, sabor ou cor" <sup>7</sup>.

Na Europa e nos Estados Unidos, as principais matérias primas usadas para produção de *vodka* e *gin*, são o trigo e o milho. O trigo também é utilizado na produção de *vodka* na Europa Central e para a produção de *korn*, um destilado menos purificado que a *vodka* e bebidas similares. Batatas são largamente utilizadas como fonte para destilados neutros, como *aquavit* e na Polônia e na Rússia, para obtenção de *vodka*. Muitas destilarias na Europa central são equipadas para utilizarem grãos e batatas, dependendo de qual está mais favorável economicamente. Os meios de se preparar o mosto da fermentação variam de acordo com a natureza das matérias primas. Mosturação por infusão é feita quando se utiliza pequenos grãos, como trigo, mas o processo de cozimento é requerido para o milho e outros cereais. Cozedores de banho

ou contínuos são utilizados e o processo de maltagem dos grãos é uma prática comum, especialmente nos Estados Unidos <sup>8</sup>.

## 1.2. Hidrólise de matérias primas amiláceas

O malte de grãos como a cevada é tradicionalmente utilizado para a conversão do amido em açúcares do mosto. Atualmente, enzimas industriais podem ser utilizadas e podem substituir o malte na hidrólise do amido em açúcares. Dentre as enzimas comerciais mais utilizadas para tal processo encontram-se a alfa-amilase termostável da bactéria *Bacillus subtilis* e a amiloglicosidase do fungo *Aspergillus niger* <sup>8</sup>.

A hidrólise do amido pode ser catalisada pelas enzimas amilolíticas. A  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) é uma enzima que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia de amido, ou seja, ocorre a hidrólise da cadeia linear do amido (amilose). A hidrólise da solução de amido gelificado pela alfa-amilase em polissacarídeos de menor peso molecular provoca uma rápida diminuição da viscosidade da pasta de amido e perda da capacidade de coloração por iodo. A diminuição da viscosidade da solução é chamada de liquefação do amido. Os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são produtores de alfa amilase fúngica <sup>9,10</sup>.

A amiloglicosidase, também conhecida como glicoamilase (EC. 3.2.1.3), tem capacidade de hidrolisar tanto ligações  $\alpha$ -1,4 como as ligações  $\alpha$ -1,6 da cadeia de amido, ou seja, tem a capacidade de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, embora em uma razão menor que as ligações  $\alpha$ -1,4, fornecendo quase a degradação completa do amido em glicose. Esta ação resulta na formação de glicose, monossacarídeo que aumenta a doçura da solução, motivo pelo qual a amiloglicosidase é chamada de enzima sacarificante <sup>9,10</sup>.

Entre as várias fontes, as amiloglicosidases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* são muitas vezes consideradas como tendo um grande valor comercial. Demonstrou-se que as amiloglicosidases fúngicas possuem aplicações significativas na indústria alimentar, principalmente na produção de xarope de glicose/frutose e etanol <sup>11</sup>. A Figura 3 apresenta as estruturas moleculares das enzimas alfa amilase de *Aspergillus oryzae* e amiloglicosidase de *Aspergillus niger*.

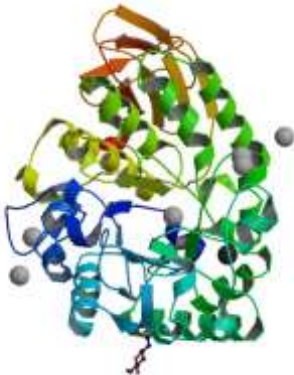

	Alfa amilase	Amiloglicosidase
		
Classificação	Hidrolase	Hidrolase
Microrganismo	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Peso molecular	53 kDa	54 kDa

Figura 3: Estruturas moleculares das enzimas alfa amilase de *Aspergillus oryzae* e amiloglicosidase de *Aspergillus niger*

Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/>

*Aspergillus niger* é um dos microrganismos mais importantes utilizados na biotecnologia. Tem estado em uso já há muitas décadas para produzir enzimas extracelulares (usadas em alimentos) e ácido cítrico. De fato, o ácido cítrico e muitas enzimas de *A. niger* são considerados GRAS pelo FDA. "GRAS" é um acrônimo para a frase *Generally Recognized as Safe* (Geralmente reconhecido como seguro). Além disso, *A. niger* é utilizado para biotransformações e tratamento de resíduos. Nas últimas duas décadas, *A. niger* foi desenvolvido como um importante hospedeiro de transformação para sobre-expressar enzimas para uso na indústria de alimentos <sup>12</sup>.

A longa história de uso extensivo de *A. oryzae* em indústrias de fermentação de alimentos levou as aplicações industriais de *A. oryzae* a serem listadas como GRAS pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA. De acordo com as seções 201 (s) e 409 da Lei Federal dos EUA de Alimentos, Drogas e Cosméticos, qualquer substância adicionada intencionalmente aos alimentos é um aditivo alimentar, sujeito a revisão e aprovação pré-comercial pela FDA. A substância é reconhecida entre peritos qualificados como tendo sido adequadamente demonstrado que é segura nas condições da sua utilização pretendida <sup>13</sup>.

A segurança do organismo é também apoiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Embora *A. oryzae* seja geneticamente muito próximo de *A. flavus*, que é

conhecido por produzir um carcinógeno natural, a aflatoxina, esse fungo não tem registro de produzir aflatoxina. Os alimentos fermentados produzidos por *A. oryzae* demonstraram estar livres de aflatoxinas. Assim, apesar de *A. oryzae* ser geneticamente muito similar ao *A. flavus*, esse fungo é genomicamente bem caracterizado e considerado um microrganismo de segurança para a produção de enzimas para uso em alimentos, porque não tem a capacidade de produzir aflatoxina ou quaisquer outros metabólitos cancerígenos <sup>13</sup>.

### **1.3. Destilados Nacionais: cachaça e tiquira**

As bebidas alcoólicas são de uso corrente e comum na sociedade brasileira. O Brasil é um dos maiores produtores de destilados alcoólicos do mundo <sup>14</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) informou um consumo per capita anual de 7,09 litros, no ano de 2007 no Brasil. A cerveja foi a bebida mais consumida, com 3,73 litros, seguindo-se os destilados, com 3,07 litros e o vinho, com 0,28 litros per capita <sup>1</sup>.

A Cachaça (aguardente de cana-de-açúcar) é o primeiro destilado que foi produzido na América Latina. É muito provável que a Cachaça tenha sido destilada (intencionalmente) pela primeira vez, entre 1516 e 1526, em algum engenho estabelecido na Feitoria de Itamaracá, que mais tarde, a partir de 1534, veio a se transformar na Capitania de Itamaracá, no atual litoral pernambucano (Figura 4). Tem origem do nome a partir da palavra *Cachaza*, da língua espanhola, que significa bagaceira ruim <sup>15</sup>.





Figura 4: Moagem da cana de açúcar nos engenhos do nordeste do Brasil

Fonte: [http://www2.uol.com.br/historiaviva/reportagens/img/cachaca\\_uma\\_dose\\_de\\_historia\\_2013-07-03162037.jpg](http://www2.uol.com.br/historiaviva/reportagens/img/cachaca_uma_dose_de_historia_2013-07-03162037.jpg)

Cachaça é a bebida com graduação alcoólica de 38% vol. (trinta e oito por cento em volume) a 54% vol. (cinquenta e quatro por cento em volume) a 20°C (vinte graus Celsius), obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6,0 g L<sup>-1</sup> (seis gramas por litro), expressos em sacarose <sup>16</sup>.

Os açúcares simples são os principais substratos para a obtenção de bebidas alcoólicas e na cachaça esses açúcares (principalmente sacarose) são obtidos diretamente da cana-de-açúcar. No que se refere às bebidas alcoólicas que são provenientes de matérias primas amiláceas, tais como uísque e *vodka*, para a produção de etanol a partir de amido, é necessário que ocorra o processo de liquefação e sacarificação do amido, gerando maltose e outros açúcares fermentescíveis que possam ser transformados em etanol durante o metabolismo de microrganismos como *S. cerevisiae* <sup>17</sup>.

Bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas são preparadas na América do Sul desde os tempos pré-colombianos. Os ameríndios preparavam diversas bebidas a partir de produtos amiláceos como milho e mandioca <sup>18</sup>. O conhecimento dos povos indígenas que vivem nas diferentes regiões do Brasil na produção de alimentos fermentados é digno de documentação. Várias tribos brasileiras (Araweté, Kayapó, Karajá, Javaé e Tapirapé) utilizam fermentação em pequena escala para a conservação da mandioca e para a elaboração de pratos e alimentos fermentados com mandioca.

Algumas tribos usam processos fermentativos para produzir alimentos e bebidas fermentadas com valor nutricional, como estimulante e para fins médicos e religiosos <sup>19</sup>.

Os índios Tapirapé da tribo Tapi'itãwa, produzem vários alimentos fermentados, dentre estes, encontra-se a bebida chamada "cauim". Estes índios vivem próximos à cidade de Confresa no Estado de Mato Grosso. Para a elaboração do cauim pode-se utilizar como substrato várias fontes de carboidratos tais como: arroz, mandioca, milho, amendoim e outros <sup>20</sup>.

Semelhante ao cauim, por sua origem amilácea, a tiquira é a aguardente que tem origem indígena, resultante de um processo fermentação a partir do amido da mandioca, <sup>21</sup>. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz nativa da Amazônia, América do Sul e é amplamente cultivada em países tropicais (Figura 5). Os tubérculos de mandioca são ricos em amido e são usados principalmente para a nutrição humana, sendo um alimento básico na cultura de subsistência nos trópicos <sup>20</sup>.



Figura 5: Raiz de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz

Fonte:[http://plantillustrations.org/ILLUSTRATIONS\\_HD\\_/190506.jpg](http://plantillustrations.org/ILLUSTRATIONS_HD_/190506.jpg)

O produto de maior valor agregado da mandioca é o amido, um carboidrato encontrado em abundância na natureza. Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto de unidades de D-glicose, constituído por duas porções distintas: amilose e amilopectina. Esses dois componentes do amido diferem-se entre si, quanto ao peso molecular, ao grau de polimerização de suas cadeias e disposição

dos mesmos no interior do grânulo. A amilose é um polissacarídeo linear formado por unidades de glicoses unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 representa a região ramificada do amido e além das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, possui ramificações mediante ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 (Figura 6 )<sup>22-24</sup>.

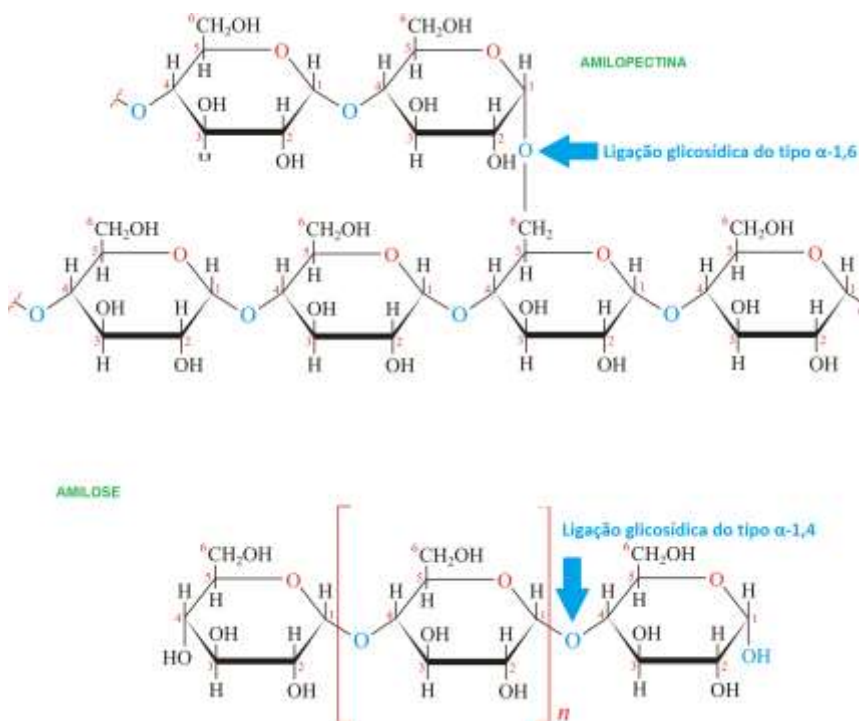


Figura 6: Estrutura do amido, apresentando estrutura da amilose (polímero linear composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D- glicoses unidas em  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6)

Fonte: <http://cdn1.askiitians.com/Images/>

No Brasil, a tiquira é uma aguardente de mandioca apreciada nas regiões norte e nordeste do Brasil, com maior produção no estado do Maranhão. O nome tiquira tem origem no Tupi e vem da palavra tykir, que significa cair gota a gota, uma referência ao processo de destilação. É uma bebida originária da cultura indígena, a partir do fermentado cauim (bebida alcoólica fermentada de mandioca ou de milho)<sup>18,24</sup>.

No processo tradicional de fabricação da tiquira, a transformação de amido da mandioca em açúcares (liquefação e sacarificação) é feita por bolores autóctones, provenientes do meio ambiente de produção. As raízes de mandioca, após serem lavadas e descascadas, são raladas e prensadas. A massa prensada é esfarelada e

distribuída sobre a superfície de uma chapa quente aquecida à lenha para formar bolos de 30 cm de diâmetro e 3 a 4 cm de espessura (Figura 7). Pelo aquecimento uniforme de ambos os lados do bolo, haverá a gelificação do amido próximo às superfícies externas, resultando na formação do beiju. Os beijus são colocados em local sombreado e com atmosfera úmida, o que permite a proliferação espontânea dos esporos e dos fungos naturais do ambiente. Os fungos que crescem de forma predominante nos beijus são: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Neurospora sitophila*. No início, os bolores crescem apenas superficialmente e, depois de alguns dias, o micélio penetra no interior do beiju, hidrolisando o amido através da atividade de enzimas amilolíticas exógenas. A representação gráfica do processo está apresentada no Anexo I desse documento<sup>18,21,24</sup>.



Figura 7: Beijus utilizados no processo de fabricação de tiquira.

Fonte: <http://2.bp.blogspot.com/P1263229.JPG>

A tiquira encontra-se dentro da legislação brasileira como uma aguardente, com graduação alcoólica de 36 a 54 % em volume, obtida de destilado alcoólico simples de mandioca ou pela destilação de seu mosto fermentado. Entre as bebidas derivadas da mandioca, apenas a tiquira possui legislação específica (Figura 8).



Figura 8: Tiquira comercializada no Maranhão

Fonte: <https://www.papodebar.com/wp-content/uploads/2009/11/garrafas-tiquira.jpg>

#### **1.4. Congêneres e análises de bebidas alcoólicas destiladas**

Os congêneres são compostos secundários diferentes do etanol que ocorrem naturalmente em bebidas alcoólicas como resultado dos processos de fermentação e destilação. Enquanto o etanol em si é a principal fonte dos efeitos psicoativos (cognitivo e comportamental), o papel dos congêneres é de interesse devido à toxicidade potencial de muitos deles, apesar de suas quantidades mínimas nas bebidas alcoólicas <sup>25</sup>.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registra e fiscaliza as bebidas alcoólicas no Brasil. A qualidade na elaboração e industrialização desses produtos deve ser atestada para que não ofereçam riscos à saúde humana. As matérias-primas inadequadas para consumo devem ser isoladas durante os processos produtivos para evitar contaminação química, física ou microbiológica <sup>26</sup>.

Para se avaliar a qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, o método de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG/FID), demonstra-se ideal, determinando os analitos representativos dos parâmetros “coeficiente de congêneres” e “contaminantes orgânicos”, definidos pela IN-13/2005 (Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça), aplicável às matrizes de bebidas fermentadas, destiladas e alcoólicas mistas em geral <sup>27</sup>.

A presença do metanol é indesejável na aguardente, pelas características de toxicidade, mesmo em baixas concentrações. A origem deste álcool está associada à degradação da pectina, um polissacarídeo sempre presente na cana-de-açúcar, embora com baixos teores de ocorrência <sup>28</sup>. A mandioca contém pectina (2,19-2,46% de pectina

total determinada em massa úmida), podendo gerar metanol durante os processos fermentativos na produção de tiquira <sup>29</sup>.

A ingestão de um alto conteúdo de metanol pode provocar intoxicação aguda e morte. Uma vez metabolizado, o metanol é oxidado a pela enzima álcool desidrogenase a formaldeído, a seguir a oxidado a ácido fórmico pela enzima formaldeído desidrogenase e por fim, a dióxido de carbono por meio da enzima catalase, provocando acidose, alterando o sistema respiratório, podendo levar a cegueira, convulsões e óbito <sup>30-32</sup>.

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

**Avaliar** o método de obtenção de tiquira (Aguardente de Mandioca), por meio do processo de liquefação e sacarificação do amido de mandioca mediado pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Realizar hidrólise enzimática do amido através do cultivo do fungo *Aspergillus oryzae* sobre a mandioca triturada para obtenção do mosto de fermentação;

2.2.2. Realizar hidrólise enzimática do amido através da incubação da mandioca triturada com a suspensão fúngica de *Aspergillus oryzae* e amiloglicosidase comercial obtida de *Aspergillus niger* para obtenção do mosto de fermentação;

2.2.3. Realizar fermentação alcoólica do mosto de mandioca hidrolisado com levedura comercial para obtenção do fermentado alcoólico;

2.2.4. Realizar a destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de mandioca;

2.2.5. Realizar as análises físico-químicas da aguardente de mandioca.



# MÉTODOS

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo do *Aspergillus oryzae* em arroz para obtenção de suspensão fúngica**

O cultivo do *Aspergillus oryzae* foi conduzido em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 25 g de arroz e 75 mL água destilada. Todos os erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 20 min. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias. A massa fúngica obtida foi diluída em 100 mL de água destilada.

O meio para produção inicial dos fungos foi constituído por 25 mL do Agar Sabouraud dextrose distribuído de forma inclinada em frascos erlenmeyers de 50 mL. Após solidificação do meio, o microrganismo *Aspergillus oryzae* foi repicado no meio. Após o crescimento do fungo, incubado a 24°C por 5 a 7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril, para obter uma solução de esporos.

#### **3.2. Preparo da matéria-prima**

As raízes de mandioca do cultivar Mandioca Amarela foram cultivadas na Região Rural de Sobradinho, Brasília, Distrito Federal e foram colhidas em agosto de 2015. No laboratório, a matéria prima foi triturada para a redução da dimensão do tubérculo. Para o preparo da solução de mandioca, 250 g de mandioca foram adicionadas em 750 mL de água e foi feito o processo de cozimento da matéria prima para que ocorresse a gelificação do amido.

#### **3.3. Processo de hidrólise enzimática dupla (liquefação e sacarificação) do amido da mandioca**

Para o processo de hidrólise do amido de mandioca, 500 mL de solução de mandioca gelificada foi adicionada de 100 mL da suspensão fúngica do *Aspergillus*

*oryzae* e 0,8 mL de amiloglicosidase comercial obtida do *Aspergillus niger* (AMG 300 L, Novozymes). A mistura foi mantida por 12 h em banho-maria a 45°C. Foi utilizado um total 2,5 kg de massa de mandioca e 7,5 litros de água destilada, obtendo-se aproximadamente 10 litros de mosto.

### **3.4. Fermentação alcoólica**

Cerca de 100 mL do mosto hidrolisado foi utilizado para a ativação da levedura seca da marca: Fermentis®; Cepa S-04, sendo deixado por 30 minutos antes ser integrada ao mosto. O material a ser fermentado foi mantido a 27°C por 7 dias, em garrações de 5 litros, previamente sanitizados. Após a fermentação, o fermentado foi filtrado para remoção do bagaço, antes de ser destilado, obtendo-se 4,9 litros de fermentado. O fermentado alcólico foi bidestilado, sendo eliminadas as frações cabeça e cauda, na segunda destilação.

### **3.5. Análises do destilado de mandioca**

O grau alcoólico foi determinado com uso de alcoômetro de Gay-Lussac colocado diretamente em volume de destilado a 20°C. A acidez total, fixa e volátil foi determinada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz <sup>33</sup>. As análises de furfural, metanol, aldeídos, ésteres e álcoois superiores foram determinadas por cromatografia gasosa <sup>34</sup>. As frações cabeça e coração da aguardente de mandioca foram analisadas no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, Piracicaba, SP).

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Artigo publicado

Journal of Agricultural Science; Vol. 8, No. 9; 2016  
ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760  
Published by Canadian Center of Science and Education

---

## Cassava Biomass Transformation by *Aspergillus oryzae*

Igor A. De Souza<sup>1</sup>, Paulo G. B. D. Nascimento<sup>1</sup>, Daniela C. Orsi<sup>1</sup> & Claire Nain Lunardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Correspondence: Claire Nain Lunardi, Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. E-mail: clunardi@unb.br

Received: March 10, 2016 Accepted: May 4, 2016 Online Published: August 15, 2016

doi:10.5539/jas.v8n9pxx URL: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v8n9pxx>

### Abstract

The cassava spirit, known as *tiquira*, is produced mainly in the north region of Brazil and it is regulated by Brazilian legislation. This study aimed to evaluate the traditional method of cassava spirit production, using a controlled process with application of fermentation technology in a laboratory scale production. *Aspergillus oryzae* was used for liquefaction and saccharification of cassava starch. It was obtained wort with 13.03 °Brix and 6.80% of reducing sugars. Commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used for alcoholic fermentation. After alcoholic fermentation, it was obtained fermented wort with very low volatile acidity. The cassava spirit was obtained by a double distillation process, with separation of the fractions head, heart and tail. The heart fraction of the distillate showed alcohol content of 51.56°GL. The contents of aldehydes, esters, methanol and higher alcohols (n-propyl, isobutyl and isoamyl) were determined in cassava spirit using gas chromatography. According to the results, the cassava spirit showed methanol and higher alcohols contents above the limits imposed by Brazilian legislation.

**Keywords:** cassava, spirit, distillate, *Aspergillus oryzae*, amylases

### 1. Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a root native of tropical America (Amazon region) and even before the arrival of Europeans in America it was already widespread for food crop, with several varieties. Brazil is the second largest cassava producer in the world and cassava processing in Brazil includes the production of flour (which is basically produced by the peeled grated roots, pressed and followed by dried or toasted process) and of starch, also known as *polvilho* (Cereda, 2003; Demiate & Kotovicz, 2011; Fao, 2004).

The higher value-added ingredient in cassava is the starch (the fresh roots contain about 30% of starch) and cassava can become the raw material base for an array of processed products (Abera & Rakshit, 2003; Charles & et al., 2005). The cassava spirit, known as *tiquira*, is a product derived from processed cassava little described in the literature. *Tiquira* is produced mainly in the north region of Brazil and it is regulated by Brazilian legislation, although its production is mainly artisanal (Anonymous, 2008).

In the traditional method of cassava spirit production, the wet mass of cassava is placed to mold, so the starch hydrolysis into fermentable sugars is made by native molds naturally present in the environment. The starch must be converted into simple fermentable sugars to produce ethanol as product. This is due to the fact that in the process of alcoholic fermentation, yeasts such as *Saccharomyces* are not able to produce amylolytic enzymes. After that, the mold cassava mass is mixed with water and the wort is placed to ferment. The alcoholic fermentation is also made by yeast and bacteria naturally present in the fermentation environment. In the traditional method of cassava spirit production there are no quality and technical control in the process, causing disadvantages such as low yield and a final product without quality standard (Cereda, 2003; Cereda & Carneiro, 2008; Venturini Filho, 2005).

Amylases can be obtained from several microorganisms; however the *Aspergillus* species are considered a significant source of these enzymes, once it can be obtained in higher yield. *Aspergillus oryzae* is generally recognized as a safe (GRAS) microorganism by the Food and Drug Administration and has been widely used to obtain amylases. *Aspergillus oryzae* amylases have a high efficiency in saccharification of starch (Pandey et al., 2005; Norouzian et al., 2006; Sivaramakrishnan et al., 2007).

This study aimed to evaluate the traditional method of cassava spirit production, using a controlled process with application of fermentation technology in a laboratory scale production. *Aspergillus oryzae* was used for liquefaction and saccharification of cassava starch and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast for alcoholic fermentation.

## 2. Method

### 2.1 Fungal Spore Preparation

The filamentous fungi *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn n<sup>o</sup> CCT 3940, acquired in the Foundation André Tosello (Collection of Tropical Crops). *Aspergillus oryzae* spores were Sabouraud dextrose (Prodinol<sup>®</sup> Biotecnologia S/A). Inoculum was prepared on 250 mL flasks with 50 mL Sabouraud dextrose medium. After 5-7 days of incubation at 24 °C, 30 mL of sterile distilled water was added and spores were suspended and 15 µL of the suspension were added in a Neubauer chamber, containing  $5 \times 10^6$  spores. A volume of 10 mL of suspension were added per flask was used.

### 2.2 Processing and Fermentation of Cassava

Cassava roots ((low-cyanide variety or sweet cassava), were obtained in a market of local farmers of Distrito Federal (Brazil) in July 2014. Cassava roots were acquired washed and peeled. In the laboratory, the roots were processed using a blender and the grated cassava mass was packaged and stored in a freezer at -18 °C until ready to use. The low-cyanide or absence or cyanide was assumed based on the literature and the regulation of cassava commercialization, which states that for commercial purpose cassava must have the cyanogenic glucoside's bellow 2 mg/Kg. Also, the fact of gridding and autoclave decreases the HCN concentration as well.

For gelatinization of cassava starch, 250 g of grated cassava mass were added into 1000 mL erlenmeyer flasks and autoclaved for 15 min at 121 °C. For liquefaction and saccharification of cassava starch, amylolytic enzymes ( $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase) were produced inoculating 5 µM *Aspergillus oryzae* spores (10 mL inoculum) per flask. Erlenmeyers containing cassava mass and inoculated *Aspergillus oryzae* were incubated at 24 °C for 7 days. After that, the moldy cassava mass was mixed with 250 mL of distilled water. The mixture was homogenized and incubated in a water bath at 45 °C for 1 hour to complete the enzymatic hydrolysis of starch. This process gave rise to the wort, a sugary solution. The wort was autoclaved for 15 min at 121 °C to inactivate fungi. Alcoholic fermentation of wort was performed using *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis<sup>®</sup> Yeast S-04). The dosage used was 5.75 g of dry yeast to 9 L of wort. Fermentation was carried out for 5-6 days at 24 °C. The fermented wort was filtered to separate the bagasse.

### 2.3 Distillation Procedure

Upon completion of alcoholic fermentation, the fermented wort was immediately distilled in a laboratory distiller. The temperature of the distillation process was maintained between 80 °C and 94 °C. The first distillation was made without separation of fractions. In the second distillation, the distillate was separated into 3 fractions. The first fraction (head fraction) was collected separately and corresponded to a volume

about 10% of the total volume. The intermediate fraction (heart fraction) was then collected and corresponded to a volume about 80% of the total volume. The last fraction (tail fraction) corresponded to 10% of the final volume of spirit produced. The fractions of cassava spirit were stored in bottles and maintained at 8 °C for physico-chemical and chromatography analysis.

#### 2.4 Physico-Chemical and Gas Chromatography Analysis

Analysis of pH in cassava mass, wort and fermented wort were measured using a digital potentiometer. Total acidity in wort and fermented wort were determined by titration with 0.1 N NaOH. The soluble solids were determined in wort through a benchtop refractometer at 20 °C and expressed in °Brix (AOAC, 2006). Volatile acidity in fermented wort was determined after distillation and subsequently titration with 0.1 N NaOH. The dry extract in fermented wort was determined by evaporation at 105 °C to constant weight (IAL, 2008). Reducing sugars in wort were determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959). Each parameter was analyzed in triplicate. Results are shown as mean values and standard deviation of the independent determinations and all data were treated with the aid of the MICROSOFT EXCEL® programme (version 2010).

The contents of aldehydes, esters, methanol and higher alcohols were determined using gas chromatography. Samples were spiked with the internal standard (4-methyl-2-pentanol). Aliquots of 1.0 µL were automatically injected into the gas chromatographic system (Shimadzu, QP-2010 PLUS, Tokyo, Japan) equipped with a Stabilwax-DA column (crossbond carbowax polyethylene glycol, 30 m × 0.18 mm × 0.18 µm film thickness) and a flame ionisation detector (FID). The analyses were performed at a 1:25 split ratio, in triplicate. Nitrogen was used as the carrier gas (flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>, total flow of 27 mL min<sup>-1</sup> and pressure of 252.3 kPa). The temperatures of both the injector and the detector were set at 250 °C. The oven temperature program was 40 °C for 4 min, followed by an increase to 120 at 20 °C min<sup>-1</sup>, kept for 1 min, and then up to 180 °C at 30 °C min<sup>-1</sup> and maintained for 4 min more (Bortoletto & Alcarde, 2013).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Processes of Hydrolysis and Fermentation of Cassava

In this study, enzymatic hydrolysis of cassava starch was made using a total of 4.5 kg of grated cassava mass that presented 36.69% of moisture (Table 1). According to Cereda (2003) in the traditional method of *tiquira* production, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Neurospora sitophila* are the species commonly observed in the cassava mass.

After liquefaction and saccharification of cassava starch by amylases produced by *Aspergillus oryzae*, it was obtained 9 liters of wort with 13.03 °Brix and 6.80% of reducing sugars. Cereda and Carneiro (2008) proposed a modern method for *tiquira* production using commercially thermotolerant  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase produced by *A. niger*. Proceeding hydrolysis by these commercial amylases, Bastos (2013) obtained 13-16 °Brix in the hydrolysed cassava mass hydrolysed using these commercial amylases for the modern process of *tiquira* production. In distillates production, the best results in alcoholic fermentation are obtained with worts in concentrations of 13-18 °Brix (Venturini Filho, 2005).

Table 1. Physico-chemical analysis of grated cassava mass, wort and fermented wort

Analysis	Values
Moisture (g 100 g <sup>-1</sup> ) of grated cassava mass	36.69 ± 1.35
pH of grated cassava mass	6.50 ± 0.01
pH of wort	5.89 ± 0.21
Soluble solids (°Brix) of wort	13.03 ± 0.05
Reducing sugars (g 100 g <sup>-1</sup> ) of wort	6.80 ± 0.30
pH of fermented wort	5.33 ± 0.01
Total acidity (meq L <sup>-1</sup> ) of fermented wort	9.67 ± 0.57
Volatile acidity (meq L <sup>-1</sup> ) of fermented wort	2.00 ± 0.01
Dry extract (g L <sup>-1</sup> ) of fermented wort	11.35 ± 0.28

*Note.* Results are reported as means ± standard deviation of three measurements.

The grated cassava mass showed pH of 6.50, the wort showed pH of 5.89 and the fermented wort showed a pH of 5.33. *Aspergillus oryzae* is a producer of kojic acid (5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one) (Bentley, 2006) and this explains the reduction in pH of the wort. The reduction in pH of the wort caused by the production of organic acids by fungi reduces the risk of contamination of wort with acetic or lactic bacteria, which increase the volatile acidity (acetic acid) and is undesirable in the fermentation process. The variation in pH between the wort and the fermented wort is due to organic acids formed as by-products of alcoholic fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Asquierei et al., 2009).

After alcoholic fermentation, it was obtained 4.5 liters of filtered fermented wort. The alcoholic fermented cassava presented low values of total acid (9.67 meq L<sup>-1</sup>) and volatile acidity (2.00 meq L<sup>-1</sup>). The low value of volatile acidity shows that fermented was technologically well prepared. Although *Saccharomyces* can produce acetic acid, excessive concentrations of acetic acid in wine are largely the result of the metabolism of ethanol by aerobic acetic acid bacteria. The volatile acidity in fermented cassava is far below the limit established by Brazilian legislation for wines, which is a maximum of 20.00 meq L<sup>-1</sup> (Anonymous, 1988).

### 3.2 Cassava Spirit Production and Analysis

The first distillation of fermented wort resulted in 400 mL of distilled (yield of 8.9% in comparison to the initial quantity of raw material, 4.5 kg of cassava mass) and presented an alcohol content of 24% (v/v). After the second distillation, the heart fraction of cassava spirit showed an alcohol content of 51.56% (v/v) (Table 2). This value is within the limit established by Brazilian legislation for *tiquira* which is 38-54% (v/v) (Anonymous, 2008).

Table 2. Concentration of volatile compounds (mg.100 mL anhydrous ethanol) in the cassava spirit

Compounds	Head fraction	Heart fraction	Reference values*
Ethanol % (v/v)	80.75	51.56	36-54
Volatile acidity (acetic acid)	8.37	30.70	0-100
Aldehydes (acetic aldehyde)	31.91	0.41	0-20
Esters (ethyl acetate)	69.30	4.65	0-200
Methanol	99.88	127.15	0-20
1-Butanol	3.73	2.58	0-3
2-Butanol	1.19	0.37	0-10
Isobutyl alcohol	415.33	166.41	-
Propyl alcohol	224.82	172.46	-
Isoamyl alcohol	260.69	123.62	0-300
Superior alcohols (sum of isobutanol, propanol and isoamyl alcohol)	900.84	462.49	0-300
Furfural	0.00	0.00	0-5
Cooper (mg/L)	0.00	0.02	0-5
Total volatile congeners (sum of aldehydes, esters, superior alcohols, volatile acidity and furfural)	1010.43	498.25	250-650

Note. \* Reference values established by Brazilian legislation (Brazil, 2008) to the quality of *tiquira*.

The volatile acidity of heart fraction of cassava spirit (30.70 mg acetic acid.100 mL anhydrous ethanol) was approximately 3 times lower than the tolerance limit established by Brazilian legislation (Anonymous, 2008) to the *tiquira* (100 mg acetic acid.100 mL anhydrous ethanol). This result was expected due to the low volatile acidity of the fermented wort. Duarte et al. (2011) obtained similar result of 37 mg acetic acid.100 mL anhydrous ethanol for jabuticaba spirit (a tropical fruit from Brazil) and Asquierei et al. (2009) also obtained low value of volatile acidity (30 mg acetic acid.100 mL anhydrous ethanol) for jabuticaba spirit. Bortoletto and Alcarde (2013) studied the aging of sugar cane spirits in casks of different woods.



After a period of 36 months, these authors obtained high values of volatile acidity (62.4-143.9 mg acetic acid/100 mL anhydrous ethanol) in the aged spirits. The presence of high concentrations of acetic acid may be an indicative of contamination of the wort by acetic and aerobic bacteria that could metabolize ethanol into acetic acid. (Asquiere et al., 2009; Bortoletto & Alcarde, 2013; Duarte et al., 2011; Swiegers et al., 2005). Acetaldehyde is the predominant aldehyde in spirits, corresponding to approximately 90% of total aldehydes in the distillate (Bortoletto & Alcarde, 2013). The heart fraction of cassava spirit presented very low concentration of acetic aldehyde (0.41 mg/100 mL anhydrous ethanol). Duarte et al. (2011) result of 1.12 mg acetic aldehyde/100 mL anhydrous ethanol for jabuticaba spirit. Hernandez-Gomez et al. (2005) obtained results of 20.4-57.5 mg acetic aldehyde/100 mL anhydrous ethanol in melon distillate beverages, above the tolerance limit established by Brazilian legislation (20 mg/100 mL anhydrous ethanol) (Anonymous, 2008). Acetic aldehyde is an undesired compound in distillate; mainly due to the fact that at high concentrations has a pungent odour and chemical reactivity (García-Llobodanin et al., 2008; Bortoletto & Alcarde, 2013; Soufleros et al., 2005). The presence of high concentrations of acetaldehyde in spirits is an indicative of oxidation of the ethanol during alcoholic fermentation (Asquiere et al., 2009; Bortoletto & Alcarde, 2013; Swiegers et al., 2005).

Ethyl acetate is another compound that may affect the quality of distillate due to its unpleasant flavor in high concentrations (Asquiere, et al., 2009; Duarte et al., 2011; Hernandez-Gomez et al., 2005). The heart fraction of cassava spirit presented low concentration of ethyl acetate (4.65 mg/100 mL anhydrous ethanol). García-Llobodanin et al. (2008) obtained similar results of total esters (2.1-5.5 total mg/100 mL anhydrous ethanol) for pear distillates. According to Hernandez-Gomez et al. (2003), low concentrations of ethyl acetate (5 to 8 mg/100 mL anhydrous ethanol) contribute to the distillate flavor complexity and has a positive impact on product quality. Ethyl acetate is generally the predominant ester in spirits, corresponding to approximately 80% of total esters in the distillate. Ester formation occurs during fermentation mainly due to esterification reactions between acids and alcohols of the spirit. Ethyl acetate originates from the esterification reaction between ethanol and acetic acid and its amount depends on the relative abundance of the corresponding alcohols and the acyl-coA radicals involved in yeast metabolism (Asquiere et al., 2009; Bortoletto & Alcarde, 2013; Soufleros et al., 2005).

The cassava spirit showed lower concentrations of aldehydes and esters in the heart fraction compared to the head fraction. This results show that the distillation process and separation of the head fraction was corrected made and have a positive influence on the final distilled beverage. The head is the fraction of distillate consisting mainly of volatiles components that distill first, or have low boiling point (BP) and are soluble in alcohol. Most are separated at the beginning of the distillation and their concentrations are relatively higher in the first distillate fractions. Acetaldehyde (BP = 21 °C), methanol (BP = 64.6 °C) and ethyl acetate (BP = 77 °C) are included in this group (Alcarde et al., 2010).

Methanol is an important compound to control in the spirits and its regulation is based on associated health hazards. The concentration of methanol in cassava spirit was found to be 99.88 mg/100 mL anhydrous ethanol in head fraction and 127.15 mg/100 mL anhydrous ethanol in heart fraction. These values are superior to the limit established by the Brazilian law (20 mg/100 mL anhydrous ethanol) (Anonymous, 2008); however they are in accordance with the USA and European Union regulations. The United States legal limit on methanol in distilled fruit spirits is 0.35% (v/v) or 700 mg/100mL of anhydrous alcohol. The EU general methanol limit for spirits made of fruits and marc brandy is 1000-1200 mg. 100 mL of anhydrous alcohol (European Union Rules No.1567/89, 1989). Some studies in literature obtained high concentrations of methanol in fruit spirits. Duarte et al. (2011) obtained a result of 85 mg methanol/100 mL anhydrous ethanol in jabuticaba spirit, Hernandez-Gomez et al. (2005) obtained results of 150-206 mg methanol/100 mL anhydrous ethanol in melon distillates and Soufleros et al. (2005) obtained mean value of 744 mg methanol/100 mL anhydrous ethanol in a traditional Greek fruit distillate called *koumaro*.

Although methanol occurs naturally, at a low level, because it is a side product of the fermentation process, it may reach larger concentrations in some cases. In fruits spirits with high content of pectin (like plums, apples and pears) methanol is formed mainly from interaction of pectinmethylesterases (enzymes present naturally in fruits) with the pectin of the fruit. Pectinmethylesterases catalyze the hydrolysis of the methoxyl group from pectin and thus release methanol and consequently increases the concentration of methanol in fruit spirits (Bortoletto & Alcarde, 2013; Duarte et al., 2011; Soufleros et al., 2005; Zhang et

al., 2011). Methanol is metabolized in the body to formaldehyde and formic acid. Formic acid is a toxic metabolite that acts on the retina, optic nerve and central nervous system. Humans are uniquely sensitive to the toxicity of methanol as they have limited capacity to oxidize and detoxify formic acid. Thus, the toxicity of methanol in humans is characterized by metabolic acidosis, blindness or serious visual impairment and even death (Paine & Davan, 2001; Zhang et al., 2011). In the case of cassava spirit, the increase concentration of methanol probably occurred in the process of liquefaction and saccharification of cassava starch with inoculation of fungi *Aspergillus oryzae*. Cassava roots contain pectin (2.19 to 2.46% of total pectin in fresh weight basis) (Feniman, 2004) and *A. oryzae* is a producer of pectinolytic enzymes (Hoa, 2013; Sabika, 2012). These facts suggest that the pectinolytic enzymes of fungi catalyzed the hydrolysis of the methoxyl group from pectin of cassava and increased the concentration of methanol in wort, before the alcoholic fermentation process.

Higher alcohols are responsible for imparting complex sensory attributes to spirits and refer to the sum of isobutyl, propyl and isoamyl alcohols according to Brazilian legislation (Anonymous, 2008). The heart fraction of cassava spirit presented a high content of higher alcohols (498.25 mg/100 mL anhydrous ethanol) and this value was superior to the limit established by the Brazilian law (300 mg/100 mL anhydrous ethanol). Higher alcohols originate from the metabolism of nitrogen-containing compounds by yeast. The alcohols containing up to 5 carbon atoms, such as amyl and propyl alcohols, contribute to the formation of the flavoring aroma. However, the excess of higher alcohols interferes negatively in the quality of spirits (Bortoletto & Alcarde, 2013; Duarte et al., 2011; Soufleros et al., 2005).

#### 4. Conclusion

Cassava spirit production was viable on a controlled laboratory scale process using *Aspergillus oryzae* CCT 3940 for cassava starch liquefaction and saccharification instead of the commercially available enzymes. The method here describes must to be adequate to reduce the levels of methanol and higher alcohols generated during the process because the negative impacts of such compounds in product quality and human health. Further evaluation and methodological modification must be conducted aiming to improve cassava spirit production yield, and to reduce the amount of undesired toxic by-products. Our results, point out the potential hazards of the production of traditional distillates for human consumption.

#### References

- Abera, S., & Rakshit, S. K. (2003). Processing Technology Comparison of Physicochemical and Functional Properties of Cassava Starch Extracted from Fresh Root and Dry Chips. *Starch-Stärke*, 55(7), 287-296. <http://dx.doi.org/10.1002/star.200390072>
- Alcarde, A. R., Souza, P. A., & Belluco, A. E. S. (2010). Volatilization kinetics of secondary compounds from sugarcane spirits during double distillation in rectifying still. *Scientia Agricola*, 67(3), 280-286. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162010000300005>
- Anonymous. (1998). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988*. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho.
- Anonymous. (2008). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria n° 65, de 23 de abril de 2008*. Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas destiladas: Aguardente de melão, aguardente de cereal, aguardente de vegetal, aguardente de rapadura, aguardente de melado, aguardente de fruta, arac, rum, sochu, tequila, tiquira e uísque.
- AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists.
- Asquieri, E. R., Silva, A. G. D. M. E., & Cândido, M. A. (2009). Jabuticaba fruit aguardiente made from skin and sediments resulting from the production of fermented jabuticaba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4), 896-904. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400030>
- Bastos, F. A. (2013). *Otimização do processo de produção de Tiquira empregando enzimas comerciais e fungos isolados a partir dos beijos utilizados no método tradicional* (Master's thesis, Federal University of Maranhão, São Luís, Brasil). Retrieved from [http://bdd.ibict.br/vufind/Record/UFMA\\_372acd1c75c550c54e2c50b3199a6760](http://bdd.ibict.br/vufind/Record/UFMA_372acd1c75c550c54e2c50b3199a6760)
- Bentley, R. (2006). From miso, sake and shoyu to cosmetics: A century of science for kojic acid. *Nat. Prod. Rep.*, 23(6), 1046-1062. <http://dx.doi.org/10.1039/b603758p>

- Bortoletto, A. M., & Alcarde, A. R. (2013). Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. *Food Chemistry*, 139(1-4), 695-701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.053>
- Cereda, M. P. (2003). *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas* (1st ed.). São Paulo: Fundação Cargil.
- Cereda, M. P., & Carneiro, M. S. C. (2008). *Handbook of Tiquira production (cassava spirit) by traditional and modern method = Manual de Fabricação de Tiquira (Aguardente de Mandioca), por Processo Tradicional e Moderno: Tecnologias e Custos de Produção*. Cruz das Almas: Embrapa.
- Charles, A. L., Chang, Y. H., Ko, W. C., Sriroth, K., & Huang, T. C. (2005). Influence of Amylopectin Structure and Amylose Content on The Gelling Properties of Five Cultivars of Cassava Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 5-10. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048376+>
- Demiate, I. M., & Kotovicz, V. (2011). Cassava starch in the Brazilian food industry. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 388-397. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000200017>
- Duarte, W. F., Amorim, J. C., Lago, L. D. A., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2011). Optimization of fermentation conditions for production of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) spirit using the response surface methodology. *Journal of Food Science*, 76(5), C782-790. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02169.x>
- FAO (Food & Agriculture Organization of the United Nations). (2004). *A review of cassava in Latin America and the Caribbean with country case studies on Brazil and Colombia*.
- Feniman, C. M. (2004). *Caracterização de raízes de mandioca (Manihot esculenta Crantz) do cultivar IAC 576-60 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita* (Master's thesis, University of São Paulo, Piracicaba, Brasil). Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-24112004-080950/pt-br.php>
- García-Llobodanin, L., Ferrando, M., Güell, C., & López, F. (2008). Pear distillates: Influence of the raw material used on final quality. *European Food Research Technology*, 228, 75-82. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-008-0908-9>
- Hernandez-Gomez, L. F., Ubeda, J., & Briones, A. (2003). Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods. *Food Chemistry*, 82, 539-543. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00008-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00008-6)
- Hernández-Gómez, L. F., Úbeda-Iranzo, J., García-Romero, E., & Briones-Pérez, A. (2005). Comparative production of different melon distillates: Chemical and sensory analyses. *Food Chemistry*, 90, 115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.033>
- Hoa, B. T., & Hung, P. V. (2013). Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *International Food Research Journal*, 20(6), 3269-3274.
- IAL, I. A. L. (2008). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimento* (3rd ed.). São Paulo.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(4), 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Norouzian, D., Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M., Scharer, J. M., & Moo Young, M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24(1), 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.06.003>
- Paine, A., & Davan, A. D. (2001). Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human & Experimental Toxicology*, 20(11), 563-568. <http://dx.doi.org/10.1191/096032701718620864>
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R., & Larroche, C. (2005). *Enzyme Technology* (1st ed.). New Delhi: Asiatech Publishers Inc.
- Sabika, A. P., & Gyana. (2012). Multistep mutagenic strain Improvement in *Aspergillus Carbonarius* to enhance pectinase production potential. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4(2), 92-98.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(8), 621-626.
- Soufleros, E. H., Mygdalia, S. A., & Natskoulis, P. (2005). Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(7), 699-716. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.06.010>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Venturini Filho, W. G. (2005). *Tecnologia de bebida* (1st ed.). São Paulo: Edgard Blücher.
- Zhang, H., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2011). Influence of pectinase treatment on fruit spirits from apple mash, juice and pomace. *Process Biochemistry*, 46(10), 1909-1913. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbi.2011.06.020>

### **Copyrights**

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 4.2. Artigo a ser publicado

### Data in Brief

---

*Data article*

**Title:** *Data of congeners concentration in heart fraction from cassava spirit (Tiquira)*

**Authors:** *Igor A. De Sousa<sup>1</sup>, Paulo G.B.D. Nascimento<sup>1</sup>, Daniela C. Orsi<sup>1\*</sup>, Claire N. Lunardi<sup>1\*</sup>*

**Affiliations:** *<sup>1</sup>Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Brasília, Brazil*

**Contact email:***clunardi@unb.br*

#### **Abstract**

*This data article contains the data related to the research article “Cassava Biomass Transformation by Aspergillus oryzaes.” (de Souza et al., 2016). Congeners are minor compounds other than ethanol that occur naturally in alcohol beverages as a result of distilling and fermenting processes (Wilson, 2014). While ethanol itself is the main source of hangover (subjective distress) and other residual effects of alcohol (cognitive and behavioral), the role of the congeners is of interest due to the potential toxicity of many of them despite their minute quantities (Rodda, Beyer, Gerostamoulos, & Drummer, 2013). In the present study, the distillation congeners of heart fraction was analyzed from cassava spirit and distillation temperatures of 6 step procedures were presented.*

#### **Specifications Table**

<i>Subject area</i>	<i>Chemistry</i>
<i>More specific subject area</i>	<i>Fermentation Technology</i>
<i>Type of data</i>	<i>Table, equations</i>
<i>How data was acquired</i>	<i>Distillation; Physicochemical analysis</i>
<i>Data format</i>	<i>Raw, analyzed</i>
<i>Experimental factors</i>	<i>Congeners concentrations.</i>
<i>Experimental features</i>	<i>Concentrations of congeners in head and heart fractions from cassava spirit</i>
<i>Data source location</i>	<i>Brasilia, Brazil</i>
<i>Data accessibility</i>	<i>Data is with this article</i>

### **Value of the data**

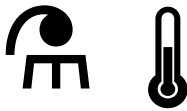
- Acidity analysis
- *Cassava spirit congeners*
- *Distillation temperatures from 6 step process*

### **Data**

*In this Data in Brief we present the temperature of distillation process of the 6 steps of cassava wort. We also present the data from dry fermented cassava wort: empty crucible weight, sample volume, final weight, and dry extract. The physicochemical analysis of cassava spirit (Heart fraction).*



Fermentation



Distillation



Analytical Step

*Contaminating microorganism, specifically lactic acid bacteria and wild yeast, that infect spirit, wine and beer production, impact on fermentation performance and spirit character (Wilson 2014). The final result of contamination is formation of acetic acid. Analyze acidity of beverages is made by titration is the most common method to determine the quality of fermentation and final product*

### **Experimental Design, Materials and Methods**

*The aim of this study was production of cassava spirit using a fungi *Aspergillus oryzae* for starch hydrolysis for production of fermentable sugars and using commercial *Saccharomyces cerevisiae* for alcoholic fermentation. To proceed with hydrolysis grated mass of cassava was incubated with *Aspergillus oryzae*. Hydrolyzed material was later submitted by trademark FERMENTIS® yeast containing yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The cassava spirit was obtained by double distillation process.*

**Table 1:** Temperature management from 6 steps of process first distillation of fermented cassava wort

First distillation	Time (minutes)	Temperature (°C)
Step 1	7.5	81
	15.0	90
	22.5	90
	30.0	90
Step 2	7.5	82
	15.0	85
	22.5	87
	30.0	88
Step 3	7.5	89
	15.0	88
	22.5	90
	30.0	87
Step 4	7,5	89
	15.0	88
	22.5	90
	30.0	87
Step 5	7.5	88
	15.0	89
	22.5	85
	30.0	90
Step 6	7.5	89
	15.0	89
	22.5	88
	30.0	90

**Table 2:** Data from dry fermented cassava wort: empty crucible weight, sample volume, final weight, and dry extract

Dry fermented cassava wort analysis	Empty crucible weight (grams)	Sample Volume (mL)	Final weight (Grams)	Dry Extract	Mean
1	27.89	20	30.14	11.55	11.35
2	26.30	20	28.53	11.15	

**Table 3:** Physicochemical analysis of cassava spirit (Heart fraction)

Variable	Value
Alcoholic degree (°GL)	54.00
Total acidity (mg acetic acid/100 ml)	30.00
Fixed acidity (mg acetic acid /100 ml)	6.00
Volatile acidity (mg acetic acid /100 ml) - Difference	24.00
Volatile acidity (mg acetic acid /100 ml de anhydrous alcohol)	0.44

**Table 4:** Acidity analysis

	NaOH Volume (milliliters)	Total acidity Meq/L
Total acidity of Fermented wort	0.9	9.7
*Volatile acidity of fermented wort	0.2	2.0
Total acidity of spirit	0.5	30.0
Fixed acidity from spirit	0.1	0.6

Expressed results in miligrams of acetic acid in 100 mL according formula:

Total and fixed acidity of spirit =  $V \times Fc \times 60$

V = used NaOH volume in titration

Fc = NaOH correction factor = 1

60 =Correspond to N of NaOH x Acetic acid equivalent x conversion factor of liters for 100 mL x conversion factor of grams to mg/sample volume  $\rightarrow (0.1 \times 60 \times 0.1 \times 1000)/10$

**\*Volatile and Total acidity of fermented wort calculus – meq/L**

$$\frac{\text{NaOH volume used in titration in milliliters} \times 1000 \times \text{Solution normality (0.1)}}{\text{Sample volume in milliliters (10)}}$$

### **Acknowledgements**

*We gratefully acknowledge CNPq, CAPES, FAPDF, DPP-UnB and FINATEC for financial Support as research and fellowship.*

### **References**

Souza I.A.; Nascimento P. G. B.D.; Orsi D.C., Lunardi C.N.; Cassava Biomass Transformation by *Aspergillus oryzae*. J Agric Sci [Internet]. 2016;8(9):37. Available from: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/58085>

Rodda, L., Beyer, J., Gerostamoulos, D., & Drummer, O. (2013). Alcohol congener analysis and the source of alcohol: a review. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 9 (2), 194-207.

Wilson, N. (2014). Chapter 8 - Contamination: bacteria and wild yeasts in a whisky fermentation. In I. R. Stewart (Ed.), *Whisky (Second edition)* (pp. 147-154). San Diego: Academic Press.



### 4.3. Análises do mosto, do fermentado alcoólico e do destilado de mandioca

A metodologia de obtenção do destilado foi modificada. Na primeira metodologia, o fungo *A. oryzae* foi incubado por 7 dias sobre a massa de mandioca e essa massa foi sacarificada pela excreção das amilases fúngicas, um processo natural do metabolismo do fungo que se desenvolveu sobre a mandioca. O problema resultante dessa metodologia foi o alto conteúdo de metanol na fração coração do destilado. Provavelmente, no período de incubação do fungo sobre a mandioca, este produziu pectinases e degradou parte da pectina da mandioca, liberando metanol no mosto.

Na segunda metodologia, a hidrólise enzimática do amido foi feita através da incubação da mandioca triturada com a suspensão fúngica de *A. oryzae* e também se utilizou amiloglicosidase comercial obtida de *A. niger* para obtenção do mosto de fermentação. O menor tempo de contato da suspensão fúngica com a massa de mandioca (12 horas em relação a 7 dias na metodologia anterior), deveria reduzir o teor de metanol do destilado. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para o mosto, o fermentado e o destilado de mandioca.

**Tabela 1: Análises do mosto, do fermentado alcoólico e do destilado de mandioca**

Sólidos solúveis (°Brix) do mosto	9,96 ± 0,05
Açúcares redutores do mosto (%)	8,17 ± 0,27
pH do mosto	3,27 ± 0,05
Acidez total do mosto (meq/L)	5,43 ± 0,25
Acidez volátil do mosto (meq/L)	0,02 ± 0,01
Volume do Mosto (L)	10
Volume do Fermentado Filtrado (L)	4,9
Sólidos solúveis (°Brix) do fermentado	4,60 ± 0,01
Volume do 1º Destilado (mL)	600
Volume do 2º Destilado (mL)	250
Acidez total do destilado (meq/L)	0,09 ± 0,29
Acidez fixa do destilado (meq/L)	0,02 ± 0,01

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão

O uso da amiloglicosidase comercial teve o propósito de aumentar os açúcares fermentescíveis (açúcares redutores) no mosto. Como pode ser observado na Tabela 1, obteve-se 9,91° Brix no mosto, um valor menor se comparado com a primeira metodologia em que se obteve 13,03° Brix no mosto. Brix é uma medida indireta para se determinar aproximadamente a quantidade de açúcares em uma amostra, contabilizando todos os sólidos solúveis contidos na amostra. No entanto, na metodologia atual o teor de açúcares redutores (8,17%) foi maior que na primeira metodologia em que se obteve 6,80% de açúcares redutores. A quantificação dos açúcares redutores se faz necessária para determinar exatamente quanto se tem de açúcares fermentescíveis na amostra, sendo os açúcares redutores o substrato para a formação do álcool. Dessa forma, o método enzimático atual em que se utilizou a enzima amiloglicosidase comercial juntamente com as amilases do fungo *A. oryzae*, mostrou-se mais eficiente, gerando mais açúcares redutores.

O rendimento do destilado na segunda metodologia de também foi maior. Na primeira metodologia, foram destilados 4,5 litros de fermentado alcoólico e obteve-se 400 mL de destilado (primeira destilação). E a fração coração resultante da segunda destilação rendeu um volume de 120 mL com teor alcoólico de 51,56%. Na segunda metodologia, foram destilados 4,9 litros de fermentado alcoólico e obteve-se 600 mL de destilado na primeira destilação. E a fração coração resultante da segunda destilação rendeu um volume de 250 mL com teor alcoólico de 48,10%. O aumento do volume do destilado e do teor alcoólico ocorreu porque a quantidade de açúcares fermentescíveis no mosto foi maior, gerando mais álcool.

#### **4.4. Análises da fração coração do destilado de mandioca por CG/FID**

A tabela 2 mostra os valores obtidos por meio da cromatografia gasosa, CG/FID na fração coração dos destilados de mandioca obtidos na primeira metodologia (hidrólise enzimática do amido através do cultivo do fungo *A. oryzae* sobre a mandioca triturada para obtenção do mosto de fermentação) e na segunda metodologia (hidrólise enzimática do amido através da incubação da mandioca triturada com a suspensão fúngica de *A. oryzae* e amiloglicosidase comercial obtida de *A. niger* para obtenção do mosto de fermentação).

**Tabela 2: Concentração de compostos voláteis (mg.100 mL álcool anidro) no destilado de mandioca**

<b>Análises</b>	<b>Primeira metodologia</b>	<b>Segunda metodologia</b>	<b>Valores de referência</b>
Grau alcoólico real a 20°C (v/v)	51,56	48,10	36-54
Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL álcool anidro)	30,70	7,77	0-100
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)	0,41	0,89	0-20
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)	4,65	3,66	0-200
Álcool metílico (mg/100mL álcool anidro)	127,15	71,21	0-20
Álcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)	0,37	nd	0-10
Álcool propílico (mg/100mL álcool anidro)	172,46	52,70	-
Álcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)	166,41	129,06	-
Álcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)	2,58	0,64	0-3
Álcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)	123,62	154,37	0-300
Álcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)	462,49	336,13	0-300
Furfural (mg/100mL álcool anidro)	0,00	nd	0-5
Coeficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)	498,25	348,46	250-650
Cobre (mg/L)	0,02	0,01	0-5

Álcoois superiores são expressos pela soma dos álcoois propílico, iso-butílico e iso-amílico  
nd = não detectado

Os valores de referência são estabelecidos pela legislação brasileira para a identidade e qualidade da tiquira.

Foi possível observar na metodologia atual, além da notável redução na acidez volátil, uma redução nos valores de metanol, de álcoois superiores e dos congêneres. A concentração de metanol foi de 127,5 mg/100mL álcool anidro na primeira metodologia para 71,21 mg/100mL álcool anidro no atual método. Essa redução no teor de metanol ainda não deixou a bebida de acordo com os valores máximos estabelecidos pela legislação brasileira (20 mg/100mL), porém tal concentração é aceitável de acordo com os parâmetros estabelecidos para bebidas destiladas pela legislação Norte Americana e Europeia <sup>35</sup>.

As sugestões de modificações futuras são filtrar o mosto hidrolisado antes da etapa de fermentação alcoólica para eliminar o bagaço que contém as maiores quantidades de pectina e assim tentar reduzir ainda mais o teor de metanol no destilado e diminuir o tempo de fermentação alcoólica de 7 dias para 3-4 dias, para reduzir o teor de álcoois superiores no destilado.

# CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÃO

Os destilados obtidos apresentaram baixa acidez, demonstrando que a fermentação foi efetuada com boa tecnologia de fermentação, sem contaminações bacterianas que pudessem comprometer as características desejáveis dos destilados.

A inserção de amiloglicosidase no processo aumentou a concentração de açúcares redutores, gerando um maior volume de aguardente no processo.

A concentração de açúcares fermentescíveis obtida nos dois métodos, ainda foi insuficiente para conseguir uma fermentação ideal de aguardente, pois gerou altas concentrações de álcoois superiores.

O tempo de fermentação deve ser ajustado no processo para reduzir as concentrações de álcoois superiores, sendo que na elaboração de cachaça é utilizado um curto período de 18 a 24 horas de fermentação <sup>16</sup>.

Os dois métodos de hidrólise enzimática da mandioca utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* geraram um teor de metanol acima do permitido pela legislação brasileira. Sugere-se fazer a modulação específica do processo de hidrólise do amido, para que as outras enzimas presentes no meio apresentem menores índices de atividade.

# **PERSPECTIVAS FUTURAS**

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Faz-se necessário trabalhar o produto utilizando novas técnicas enzimáticas de forma que se obtenham maiores índices de hidrólise do amido e um maior rendimento do destilado.

A modulação enzimática específica e mais eficiente também é necessária, com elevação das concentrações de enzimas amilolíticas no meio, redução do tempo de hidrólise do amido e conseqüentemente do tempo de ação das demais enzimas não amilolíticas, presentes no meio, de forma que o produto obtido seja adequado para o processo de fermentação alcoólica. O processo de fermentação e destilação do mosto fermentando deve também ser feito com o produto bem filtrado, isento de pectina, o principal composto precursor do metanol.

Espera-se que por meio da imobilização das enzimas amilolíticas seja possível modular o processo de hidrólise do amido, concentrando as enzimas amilolíticas e fazendo com que a hidrólise fique mais específica para o substrato amido.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acserald, G. *et al.* Consumo de Bebidas Alcólicas no Brasil – Estudo com base em fontes secundárias. 162 (2012).
2. Boyle, P. *Alcohol: Science, Policy and Public Health.* (OUP Oxford, 2013).
3. Allchin, F. R. India: The Ancient Home of Distillation? *R. Anthropol. Inst. Gt. Britain Irel.* **14**, 55–63 (1979).
4. Jarvis, L. Whiskey History: A Timeline Of Whiskey. Disponível em: <http://www.bottleneckmgmt.com/blog/whiskey-history-timeline/>
5. Macdonald, F. *Whisky, A Very Peculiar History.* (Andrews UK Limited, 2012).
6. Owens, B. & Dikty, A. *The Art of Distilling Whiskey and other spirits.* (Quarry Books, 2009).
7. Stone, J. *Making Gin & Vodka - A Professional Guide for Amateur Distillers.* (2001).
8. Jane, P. S. & Alan, H. V. *Beverages: technology, chemistry and microbiology.* (Springer Science & Business Media, 2012).
9. Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R. & Larroche, C. *Enzyme Technology.*
10. Peixoto, S. C., João, J. A., Terenzi, H. F. & Polizeli, M. de L. T. M. Rhizopus microspores var.rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylaseo Title.
11. Bagheri, A., Khodarahmi, R. & Mostafaie, A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated Aspergillus niger: Relation to starch processing. *Food Chem.* **161**, (2014).
12. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. & Dijck, P. van. On the safety of Aspergillus niger - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 426–435 (2002).
13. Machida, M., Yamada, O. & Gomi, K. Genomics of aspergillus oryzae: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Res.* **15**, 173–183 (2008).
14. Andrade-Sobrinho, L. G. De *et al.* Ethyl carbamate in alcoholic bevareges(cachaça, tiqueira, whisky and grape). *Quim. Nov.* **25**, 1074–1077 (2002).
15. Silva, J. M. da. Destilados do Mundo. in *Cachaça: Patrimônio Histórico e Cultural do Brasil* 21 (2010).
16. Souza, L. M. De, Alcarde, A. R., Lima, F. V. De & Bortoletto, A. M. *Cachaça de Qualidade.* (2013).
17. Menezes, A. G. T., Menezes, E. G. T., Alves, J. G. L. F., Rodrigues, L. F. & Cardoso, M. das G. Vodka production from potato ( *Solanum tuberosum* L. ) using three *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *J. Inst. Brew.* **122**, 76–83 (2016).
18. Venturini Filho, W. G. & Cereda, M. P. in *Tecnologia de bebidas* 525–550 (Editora Blucher, 2005).

19. Adrio, J. L. & Demain, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* **4**, 117–139 (2014).
20. Almeida, E. G., Rachid, C. C. T. C. & Schwan, R. F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 146–151 (2007).
21. Cereda, M. P. & Carneiro, M. de S. da C. *Manual de Fabricação de Tiquira (Aguardente de Mandioca), por Processo Tradicional e Moderno: Tecnologias e Custos de Produção.* (Embrapa, 2008).
22. Costa, M. R. Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando à obtenção de etanol. (2010).
23. Oliveira, D. C. Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). (2011).
24. Ribeiro, D. M. L. Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (Tiquira). (2011).
25. Rohsenow, D. J. & Howland, J. The role of beverage congeners in hangover and other residual effects of alcohol intoxication: a review. *Curr. Drug Abuse Rev.* **3**, 76–9 (2010).
26. Brasil, Ministério da Agricultura, P. e A. Bebidas. (2016). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/bebidas>.
27. Brasil, Ministério da Agricultura, P. e A. *Determinação de Congêneres e Contaminantes Orgânicos por CG / FID em Bebidas Fermentadas, Destiladas e Alcoólicas Mistas Determinação de Congêneres e Contaminantes Orgânicos por CG / FID em Bebidas Fermentadas, Destiladas e Alcoólicas Mistas.* (2013).
28. Parazzi, C., Arthur, C. M., Lopes, J. J. C. & Borges, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). *Ciência e Tecnol. Aliment.* **28**, 193–199 (2008).
29. Feniman, C. M. Caracterização das raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita. *Diss. Mestr.* (2004).
30. Alvarenga, R. M. Avaliação de parâmetros da fermentação e da destilação para adequação dos teores de compostos secundários em aguardente de banana. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2011).
31. Hang, Y. D. & Woodams, E. E. Methanol content of grappa made from New York grape pomace. *Bioresour. Technol.* **99**, 3923–3925 (2008).
32. Moreira, R. F. A., Netto, C. C. & De Maria, C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. *Quim. Nova* **35**, 1819–1826 (2012).
33. IAL, I. A. L. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimento.* (2008).

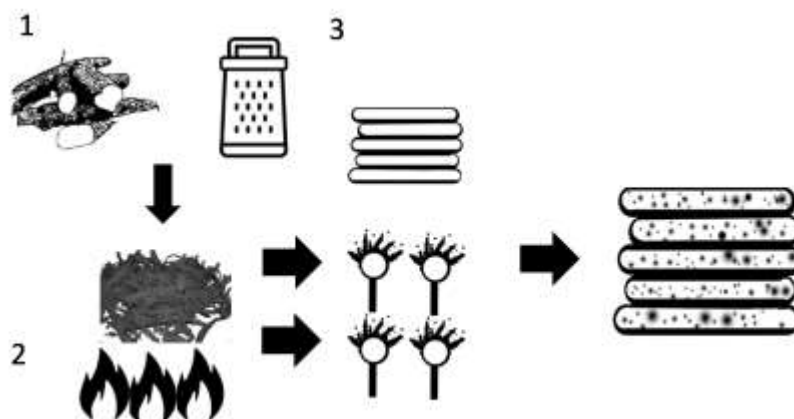
34. Bortoletto, A. M. & Alcarde, A. R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. *Food Chem.* **139**, 695–701 (2013).
35. Brasil, M. da A. P. e A. *Portaria nº 65, de 23 de Abril de 2008. Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas destiladas: aguardente de melão, aguardente de cereal, aguardente de vegetal, aguardente de rapadura, aguardente.* (2008).

# ANEXOS

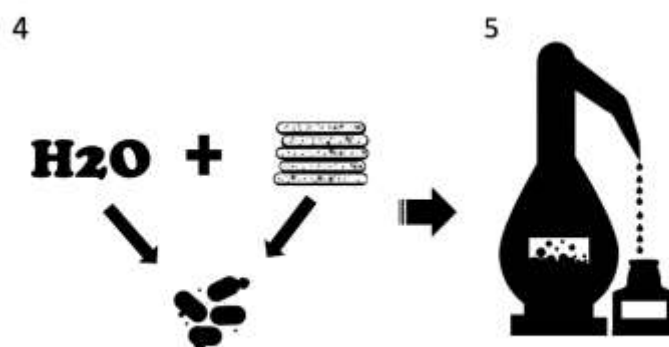
## 8. ANEXOS

### ANEXO I

#### Processo de fabricação tradicional de tiquira



- 1. Processamento da mandioca:** a mandioca é ralada e prensada para remoção de excesso de umidade;
- 2. Gelificação:** A mandioca prensada é colocada em forma de discos, sendo então aquecidos para a gelificação do amido presente na matéria-prima, sendo chamados de beijos;
- 3. Hidrólise:** Os beijos são cobertos para que possa ocorrer o crescimento de fungos autóctones.



- 4. Mosturação:** Os beijos com fungos crescidos são então misturados a água para possibilitar o processo de fermentação alcoólica;
- 5. Destilação:** O produto alcoólico é agora destilado, obtendo-se a tiquira.

## ANEXO II

### Laudo da análise da aguardente de mandioca por cromatografia gasosa



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



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

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 01-11/15

Amostras de aguardente. Interessada: Daniela Orsi.

Itens analisados / Amostras	Mandioca	Batata	Milho	Referência (IN 13)
Grau alcoólico real a 20°C (v/v)	48,10	62,89	51,18	38-54
Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL álcool anidro)	7,77	5,26	0,10	0-150
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)	0,89	16,01	13,81	0-30
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)	3,66	22,61	14,71	0-200
Álcool metílico (mg/100mL álcool anidro)	71,21	182,86	19,91	0-20
Álcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)	nd	nd	nd	0-10
Álcool propílico (mg/100mL álcool anidro)	52,70	33,52	54,92	-
Álcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)	129,06	123,77	181,54	-
Álcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)	0,64	7,71	0,31	0-3
Álcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)	154,37	175,61	259,91	-
Álcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)	336,13	332,90	496,37	0-360
Furfural (mg/100mL álcool anidro)	nd	nd	nd	0-5
Coefficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)	348,46	376,78	524,99	200-650
Cobre (mg/L)	0,01	0,02	nd	0-5

nd = não detectado

OBSERVAÇÕES: (1) A presente análise tem valor restrito à amostra recebida no laboratório. A identificação da amostra é de exclusiva responsabilidade do remetente. (2) Certificado com resultados exclusivamente destinados para a finalidade de pesquisa científica acadêmica. (3) O serviço de análises compreende exclusivamente a entrega do certificado ao interessado, não cabendo ao Laboratório e seus pesquisadores fornecerem qualquer parecer e/ou assessoria sobre certificado emitido.

#### METODOLOGIAS UTILIZADAS:

ALCARDE, A.R.; SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, v.118, n.1, p.27-31, 2012.  
BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, Reading, v.139, p.695-701, 2013.

Piracicaba, 7 de novembro de 2015.

Prof. Dr. André Ricardo Alcarde (CREA: 5060223704)  
Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas



## ANEXO III

### Classificação Qualis da revista do artigo publicado

BRASIL Acesso à Informação Participe Serviços Legislação Canais

ACESSE A PLATAFORMA

Início Sobre Solicitações Informações do Programa Consultas Manual Contato

#### Periódicos Qualis

##### Dados para Consulta

Evento de Classificação: Qualis 2014

Área de Avaliação: -- SELECIONE --

**BIOTECNOLOGIA** ✖  
**INTERDISCIPLINAR** ✖

ISSN: \_\_\_\_\_

Título: journal of agricultural science

Classificação: B1

Consultar Cancelar

##### Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1916-9752	JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE	BIOTECNOLOGIA	B1
1916-9760	JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE	INTERDISCIPLINAR	B1
1469-5148	JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE (ONLINE)	INTERDISCIPLINAR	B1
1680-7073	JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY	INTERDISCIPLINAR	B1

[Ir para o topo](#) Versão 2.4.1

Setor Bancário Norte, Quadra 3, Bloco L, Lote 06,  
CEP 70040-020 - Brasília, DF CNPJ 00889234/0001-04.  
Copyright 2010 Capes. Todos os direitos reservados.

Desenvolvido pela Cooperação



## ANEXO IV

### Página Online da Revista do Artigo Publicado



# Journal of Agricultural Science

HOME	ABOUT	LOGIN	REGISTER	SEARCH
CURRENT	ARCHIVES	ANNOUNCEMENTS	RECRUITMENT	
EDITORIAL BOARD	SUBMISSION	INDEX/LIST/ARCHIVE		
CONTACT	PUBLISHER	ETHICAL GUIDELINES		

Home > [About the Journal](#)

## About the Journal

### People

- [Contact](#)
- [Editorial Team](#)

### Policies

- [Focus and Scope](#)
- [Section Policies](#)
- [Peer Review Process](#)
- [Publication Frequency](#)
- [Open Access Policy](#)
- [Archiving](#)
- [Index/List/Archive](#)
- [Order Printed Issues](#)

### Submissions

- [Online Submissions](#)
- [Author Guidelines](#)
- [Copyright Notice](#)
- [Privacy Statement](#)
- [Author Fees](#)

### Other

- [Journal Sponsorship](#)
- [Site Map](#)
- [About this Publishing System](#)

Journal of Agricultural Science ISSN 1916-9752 (Print) ISSN 1916-9760 (Online) E-mail: [jas@ccsenet.org](mailto:jas@ccsenet.org)

Copyright © Canadian Center of Science and Education

To make sure that you can receive messages from us, please add the 'ccsenet.org' domain to your e-mail 'safe list'. If you do not receive e-mail in your 'inbox', check your 'bulk mail' or 'junk mail' folders.

### Journal Help

#### USER

Username   
Password   
 Remember me

#### INFORMATION

- [For Readers](#)
- [For Authors](#)
- [For Librarians](#)

#### FONT SIZE

#### JOURNAL CONTENT

Search   
Search Scope  
All

#### Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)
- [Other Journals](#)

#### CURRENT ISSUE

1.0  
 2.0  
 1.0

#### NOTIFICATIONS

- [View](#)
- [Subscribe](#)

## ANEXO V

### Orientações para publicação de artigo

## Paper Submission Guide

Updated: March 1, 2014

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the authorities responsible where the work was carried out. However, we accept submissions that have previously appeared on preprint servers (for example: arXiv, bioRxiv, Nature Precedings, Philica, Social Science Research Network, and Vixra); have previously been presented at conferences; or have previously appeared in other “non-journal” venues (for example: blogs or posters). Authors are responsible for updating the archived preprint with the journal reference (including DOI) and a link to the published articles on the appropriate journal website upon publication.

Copyrights for articles are retained by the authors, with first publication rights granted to the journal. Authors have rights to reuse, republish, archive, and distribute their own articles after publication. The journal/publisher is not responsible for subsequent uses of the work. Authors shall permit the publisher to apply a DOI to their articles and to archive them in databases and indexes such as EBSCO, DOAJ, and ProQuest.

The publisher and journals have a zero-tolerance plagiarism policy. We check the issue using two methods: a plagiarism prevention tool (iThenticate) and a reviewer check. All submissions will be checked by iThenticate before being sent to reviewers.

Manuscripts should be prepared in Microsoft Word or LaTeX format (based on the requirement of different journals) and submitted online. The editors reserve the right to edit or otherwise alter all contributions, but authors will receive proofs for approval before publication. If you have any questions, please contact the editor of the journal.

### Paper Selection and Publication Process

- a) Upon receipt of a submission, the editor sends an e-mail of confirmation to the submission’s author within one to three working days. If you fail to receive this confirmation, your submission e-mail may have been missed.
- b) Peer review. We use a double-blind system for peer review; both reviewers’ and authors’ identities remain anonymous. The paper will be reviewed by at least two experts: one editorial staff member and at least one external reviewer. The review process may take two to three weeks.
- c) Notification of the result of review by e-mail.
- d) If the submission is accepted, the authors revise accordingly and pay the publication fee.
- e) After publication, the corresponding author will receive two hard copies of the journal free of charge. If more copies are desired, please contact the editor before making an order.
- f) A PDF version of the journal is available for download on the journal’s webpage free of charge.

# 1. General Requirements

## *1.1 Language and Numbers*

Please write your text in proper English; American or British usage is accepted, but not a mixture of both. When writing numbers, use a period, not a comma, to represent the decimal point and a space to separate numbers of more than five digits into groups of three, whether on the left or the right of the decimal point (i.e., 10 000.471 85, but 1000.4718). We only accept manuscripts written in English.

## *1.2 Length of Paper*

Papers between 3 000 and 8 000 words are preferred.

# 2. Title Page

To ensure the integrity of the peer review process, every effort should be made to prevent the identities of the authors and reviewers from being known to each other.

When you upload a submission file, author identities should be removed from it. You should upload the title page as a supplementary file for the editor to review.

## *2.1 Title*

Be concise and informative. The title is often used in information-retrieval systems and should be no more than 12 words in length and not contain abbreviations or words that serve no purpose. If you choose to have a subtitle, it should be italicized and centered directly below the main title.

## *2.2 Authors' Names and Affiliations*

The preferred form of an author's name is first name, middle initial(s), and last name; this form reduces the likelihood of mistaken identity. To assist researchers as well as librarians, use the same form for publication throughout your career; that is, do not use initials on one manuscript and your full name on a later one. Determining whether Juanita A. Smith is the same person as J. A. Smith, J. Smith, or A. Smith can be difficult, particularly when citations span several years and institutional affiliations. Omit all titles (e.g., Dr., Professor) and degrees (e.g., PhD, PsyD, EdD).

The authors' affiliation identifies the location of the author(s) at the time the research was conducted, which is usually an institution. Include a dual affiliation only if two institutions contributed substantial support to the study. Include no more than two affiliations per author. If an author has no institutional affiliation, list the city and state of his/her residence. The names of the authors should appear in the order of their contributions, centered between the side margins. For names with suffixes (e.g., Jr. and II), separate the suffix from the rest of the name with a space instead of a comma. Only provide a complete mailing address of the corresponding author for correspondence.

*Example:*

Anne Smith<sup>1</sup>, Mary A. Meade<sup>1,2</sup>, David Wolf II<sup>1</sup> & Charles Rockefeller Jr.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Management, Northern Canada University, Toronto, Canada

<sup>2</sup> School of Economics, Peking University, Beijing, China

Correspondence: David Wolf II, School of Management, Northern Canada University, Toronto, Ontario, M3A 2K7, Canada. Tel: 1-613-947-3592. E-mail: davidwolf@gc.ca

# 3. Preparation of Text

Manuscripts should be organized in the following order:

Title; abstract; keywords (indexing terms, normally three-to-six items); introduction; material studied, area descriptions, methods and/or techniques; results; discussion; conclusion; acknowledgements; references.

### 3.1 General Rules for Text

Please use the following rules for the entire text, including abstract, keywords, headings, and references.

Font: Times New Roman; Size: 10 pt.

Paragraph Spacing: Above paragraph — 0 pt.; below paragraph — 4 pt.

Line Spacing: fixed, 12 pt.

Heading 1: Times New Roman; 10 pt.; Bold; for example, **1. First-level Heading**

Heading 2: Times New Roman; 10 pt.; Italic; for example, *1.1 Second-level Heading*

Heading 3: Times New Roman; 10 pt.; for example, 1.1.1 Third-level Heading

### 3.2 Abstract

A concise and factual abstract is required. It should be between 150 and 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results, and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but, if essential, they must be cited in full in the abstract without relying on the reference list.

### 3.3 Keywords

Immediately after the abstract, provide 3-10 keywords in alphabetical order, avoiding general and plural terms and multiple concepts (e.g., “and,” “of”). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Listing your keywords will help researchers find your work in databases.

### 3.4 Subdivision of the Article

Divide your article into clearly defined and numbered sections (e.g., 1., 2., 3., etc.). Subsections should be numbered 1.1, 1.2, etc., and sub-subsections should be numbered 1.1.1, 1.1.2, etc. Note that the abstract is not included in section numbering. Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to “the text.” Any subsection, ideally, should not be more than 600 words. Authors are urged to write as concisely as possible but not at the expense of clarity.

### 3.5 Equations

The text size of equations should be similar to normal text size. The formula should be placed center justified with serial number on the right. For example:

$$a = [(1+b)/x]^{1/2} x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (1)$$

### 3.6 Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place a table’s caption above the table’s body and its description below the body. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

For example:

Table 1. Estimated Distance (cm) for Letter and Digit Stimuli

Condition	M(SD)	95%CI	
		LL	UL
Letters	14.5(28.6)	5.4	23.6

Note. CI=confidence; LL=lower limit, UL=upper limit.

You may resize the tables to fit the page size.

### 3.7 Figures and Schemes

Number figures consecutively in accordance with their appearance in the text. Place a figure's caption and description below the figure body. A minimum resolution of 300 DPI is required. You may resize the figures or schemes to fit the page size.

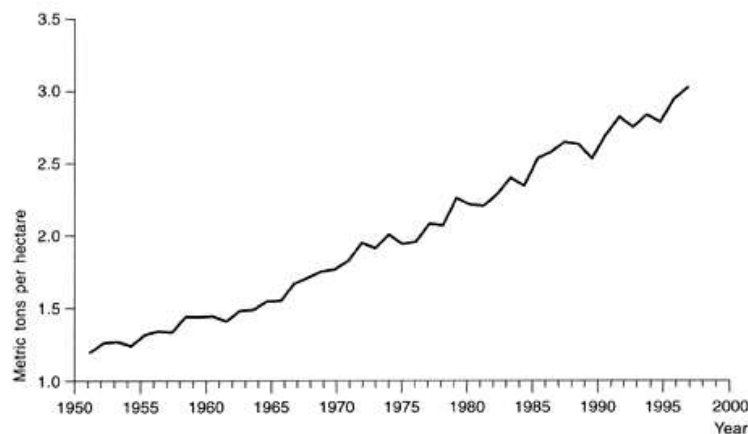


Figure 1. Figure Title

Note. Avoid abbreviating the titles of tables, figures, and equations (i.e., Tab. 1, Fig. 2, Eq. 3) in the caption or in running text. Do not write "the table above/below" or "the figure on page 32," because the position and page number of a table or figure cannot be determined until the pages are typeset.

## 4. References

Cite the work of those individuals whose ideas, theories, or research have directly influenced your work. They may provide key background information, support or dispute your thesis, or offer critical definitions and data. Citation of an article implies that you have personally read the cited work. In addition to crediting the ideas of others that you used to build your thesis, provide documentation for all facts and figures that are not considered common knowledge.

### 4.1 Citations in the Text

Each reference cited in the text must appear in the reference list, and each entry in the reference list must be cited in the text. However, two kinds of material are cited only in the text: references to classical works such as the Bible and the Qur'an, whose sections are standardized across editions, and references to personal communication. References in a meta-analysis are not cited in-text unless they are also mentioned in the text.

When formatting an in-text citation, give, in parentheses, the last name of the author of the cited work and the year it was published. For unpublished or informally published works, give the year the work was produced. Write "in press" in parentheses for articles that have been accepted for publication but that have not yet been published. Do not give a date until the article has actually been published.

In all other instances, citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association.

*Examples:*

❖ *A Work by Two Authors*

Name both authors in the signal phrase or in the parentheses each time you cite the work. Use the word “and” between the authors’ names within the text; use the ampersand in the parentheses.

Research by Wegener and Petty (1994) supports...  
(Wegener & Petty, 1994)

❖ *A Work by Three to Five Authors*

List all the authors in the signal phrase or in parentheses the first time you cite the source.

(Kernis, Cornell, Sun, Berry, & Harlow, 1993)

In subsequent citations, only use the first author’s last name followed by “et al.” in the signal phrase or in parentheses.

(Kernis et al., 1993)

❖ *Six or More Authors*

Use the first author’s last name followed by et al. in the signal phrase or in parentheses.

Harris et al. (2001) argued...  
(Harris et al., 2001)

❖ *Authors with the Same Last Name*

To prevent confusion, use first initials when citing two or more authors with the same last name.

(E. Johnson, 2001; L. Johnson, 1998)

❖ *Unknown Author*

If the work does not have an author, cite the source by its title in the signal phrase or use the first word or two in the parentheses. Titles of books and reports are italicized; titles of articles, chapters, and Web pages are put in quotation marks.

A similar study was done of students learning to format research papers.

Note: In the rare case that “Anonymous” is used for the author, treat it as the author’s name in parentheses and the reference page.

(Anonymous, 2001)

❖ *Organization as an Author*

If the author is an organization or a government agency, mention the organization in the signal phrase or in the parenthetical citation the first time you cite the source.

According to the American Psychological Association (2000), ...

If the organization has a well-known abbreviation, include the abbreviation in brackets behind the full name of the organization the first time the source is cited and then use only the abbreviation in later citations.

First citation: (Mothers Against Drunk Driving [MADD], 2000)

Second citation: (MADD, 2000)

#### *4.2 Citing and Listing of Web References*

As a minimum, the full URL should be given. Any further information (author names, dates, reference to a source publication, etc.), if known, should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or they can be included in the reference list.

### 4.3 Reference List

Please find the below information for basic rules in a reference list.

- Each entry in your reference list should be defined by a hanging indent of two characters.
- Authors' names are inverted (last name first); give the last name and initials for all authors of a particular work if it has three to seven authors. If the work has more than seven authors, list the first six authors and then use ellipses after the sixth author's name. After the ellipses, list the last author's name of the work. Use "&" instead of "and" when listing multiple authors of a single work.
- Reference list entries should be alphabetized by the last name of the first author of each work.
- If you have more than one article by the same author, single-author references or multiple-author references with the exact same authors in the exact same order are listed in order by the year of publication, starting with the earliest.
- Capitalize all major words in journal titles.
- When referring to any work that is not a journal, such as a book, article, or Web page, capitalize only the first letter of the first word of a title and subtitle, the first word after a colon or a dash in the title, and proper nouns. Do not capitalize the first letter of the second word in a hyphenated compound word.

### 4.4 DOIs in References

The journal/publisher encourages authors to cite those items (journal articles, conference proceedings, book chapters, technical reports, working papers, dissertations, etc.) that have DOIs. When the cited items have DOIs, the authors should add DOI persistent links to the regular references. The DOI persistent links should be the last elements in the references. The persistent links should be active.

Format of persistent link: <http://dx.doi.org/+DOI>

Example of persistent link: <http://dx.doi.org/10.1109/2.901164>

The authors or editors may retrieve articles' DOIs at <http://www.crossref.org/SimpleTextQuery/>.

You can register a free account to start retrieving articles' DOIs. CrossRef allows you to check multiple references. Please read this webpage very carefully. Only articles with assigned DOIs can be retrieved through this webpage.

### 4.5 References Examples

#### Books

##### ❖ **Book with one author**

Bernstein, T. M. (1965). *The careful writer: A modern guide to English usage* (2nd ed.). New York, NY: Atheneum.

##### ❖ **Electronic book**

Replace place-of-publication and publisher information with the DOI.

Anderson, C. A., Gentile, D. A., & Buckley, K. E. (2007). *Violent video game effects on children and adolescents: Theory, research and public policy*. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195309836.001.0001>

*Note: Insert a blank space if you need to break a URL across lines before most punctuation. Do not add a period after the URL.*

##### ❖ **Work with two authors**

Beck, C. A. J., & Sales, B. D. (2001). *Family mediation: Facts, myths, and future prospects*. Washington, DC: American Psychological Association. <http://dx.doi.org/10.1037/10401-000>

##### ❖ **Two or more works by the same author**

Arrange by the year of publication, the earliest first.

Postman, N. (1979). *Teaching as a conserving activity*. New York, NY: Delacorte Press.

Postman, N. (1985). *Amusing ourselves to death: Public discourse in the age of show business*. New York, NY: Viking.

*If works by the same author are published in the same year, arrange alphabetically by title and distinguish the documents by adding a lowercase letter after the year of publication as indicated below.*

McLuhan, M. (1970a). *Culture is our business*. New York, NY: McGraw-Hill.

McLuhan, M. (1970b). *From cliché to archetype*. New York, NY: Viking Press.

❖ **Book by a corporate author**

*Associations, corporations, agencies, government departments, and organizations are considered authors when there is no single author.*

American Psychological Association. (1972). *Ethical standards of psychologists*. Washington, DC: American Psychological Association.

❖ **A book with no author or editor listed**

*Merriam-Webster's collegiate dictionary* (10th ed.). (1993). Springfield, MA: Merriam-Webster.

❖ **A translated work and/or a republished work**

Laplace, P. S. (1814/1951). *A philosophical essay on probabilities* (F. W. Truscott & F. L. Emory, Trans.). New York: Dover.

## **Anthologies, Course Packs, & Encyclopedias**

❖ **Anthology or compilation**

Gibbs, J. T., & Huang, L. N. (Eds.). (1991). *Children of color: Psychological interventions with minority youth*. San Francisco, CA: Jossey-Bass.

❖ **Work in an anthology or an essay in a book**

Bjork, R. A. (1989). Retrieval inhibition as an adaptive mechanism in human memory. In H. L. Roediger III, & F. I. M. Craik (Eds.), *Varieties of memory & consciousness* (pp. 309-330). Hillsdale, NJ: Erlbaum.

❖ **Work in a course pack**

Goleman, D. (2009). What makes a leader? In D. Demers (Ed.), *AHSC 230: Interpersonal communication and relationships* (pp. 47-56). Montreal, Canada: Concordia University Bookstore. (Reprinted from *Harvard Business Review*, 76(6), pp. 93-102, 1998).

❖ **Article in a reference book or an entry in an encyclopedia**

*If the article/entry is signed, include the author's name; if unsigned, begin with the title of the entry*

Guignon, C. B. (1998). Existentialism. In E. Craig (Ed.), *Routledge encyclopedia of philosophy* (Vol. 3, pp. 493-502). London, England: Routledge.

## **Articles**

❖ **Article in a journal—for articles retrieved online**

Mellers, B. A. (2000). Choice and the relative pleasure of consequences. *Psychological Bulletin*, 126, 910-924. <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.126.6.910>

*Note: List only the volume number if the periodical uses continuous pagination throughout a particular volume. If each issue begins with page 1, then list the issue number as well.*

Klimoski, R., & Palmer, S. (1993). The ADA and the hiring process in organizations. *Consulting Psychology Journal: Practice and Research*, 45(2), 10-36. <http://dx.doi.org/10.1037/1061-4087.45.2.10>

❖ **Articles in a journal, more than seven authors**

Gilbert, D. G., McClernon, J. F., Rabinovich, N. E., Sugai, C., Plath, L. C., Asgaard, G., ... Botros, N. (2004). Effects of quitting smoking on EEG activation and attention last for more than 31 days and are more severe with



stress, dependence, DRD2 A 1 allele, and depressive traits. *Nicotine and Tobacco Research*, 6, 249-267.  
<http://dx.doi.org/10.1080/14622200410001676305>

❖ **Article in a newspaper or magazine**

Semenak, S. (1995, December 28). Feeling right at home: Government residence eschews traditional rules. *Montreal Gazette*, p. A4.

Schwartz, J. (1993, September 30). Obesity affects economic, social status. *The Washington Post*, pp. A1, A4.

Driedger, S. D. (1998, April 20). After divorce. *Maclean's*, 111(16), 38-43.

❖ **Article from an electronic source**

Zhao, S., Grasmuck, S., & Martin, J. (2008). Identity construction on Facebook: Digital empowerment in anchored relationships. *Computers in Human Behavior*, 24(5), 1816-1836.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chb.2008.02.012>

URL for an online periodical:

Cooper, A., & Humphreys, K. (2008). The uncertainty is killing me: Self-triage decision making and information availability. *E-Journal of Applied Psychology*, 4(1). Retrieved from <http://ojs.lib.swin.edu.au/index.php/ejap/article/view/124/129>

Cress, C. M. (2009). *Curricular strategies for student success and engaged learning* [PowerPoint slides]. Retrieved from [http://www.vtcampuscompact.org/2009/TCL\\_post/presenter\\_powerpoints/Christine%20Cress%20-%20Curricular%20Strategies.ppt](http://www.vtcampuscompact.org/2009/TCL_post/presenter_powerpoints/Christine%20Cress%20-%20Curricular%20Strategies.ppt)

## Doctoral Dissertations and Master's Theses

❖ **Unpublished theses and dissertations**

Jordan, J. J. (2005). *Psychosocial effects of gifted programming* (Unpublished master's thesis). University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

Berg, D. H. (2003). *Prospective leadership development in colleges and universities in Canada: Perceptions of leaders, educators and students* (Unpublished doctoral dissertation). University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

❖ **Electronic theses and dissertations**

Hiebert, R. W. (2006). *The education of children from poverty: A descriptive case study of a public school and a community school* (Doctoral dissertation). Available from ProQuest Dissertation & Theses: Full Text (NR18185).

Richet, E. (2007). *The citizenship education system in Canada from 1945-2005: An overview and assessment* (Master's thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada). Retrieved from <http://library2.usask.ca/etd>

## Meetings and Symposia

❖ **Proceedings published in a book form**

McKay, G. (1999). Self-determination in Aboriginal education. In L. B. Muller (Ed.), *Changing the climate: Proceedings of the 1998 Conference for Graduate Students in the Social Sciences and Humanities* (pp. 1-11). Saskatoon, Canada: University of Saskatchewan.

❖ **Proceedings published regularly online**

Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., Kaas, J. H., & Lent, R. (2008). The basic nonuniformity of the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 12593-12598.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0805417105>

❖ **Paper presentation or poster session**

Liu, S. (2005, May). *Defending against business crises with the help of intelligent agent based early warning solutions*. Paper presented at the Seventh International Conference on Enterprise Information Systems, Miami, FL. Abstract retrieved from [http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts\\_2005.htm](http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts_2005.htm)

## Multimedia

### ❖ *Television or radio program*

MacIntyre, L. (Reporter). (2002, January 23). Scandal of the century [Television series episode]. In H. Cashore (Producer), *The fifth estate*. Toronto, Canada: Canadian Broadcasting Corporation.

### ❖ *Film, video recording or DVD*

Kubrick, S. (Director). (1980). *The shining* [Motion picture]. United States: Warner Brothers.

### ❖ *Online lecture notes and presentation slides (such as Moodle)*

Cress, C. M. (2009). *Curricular strategies for student success and engaged learning* [PowerPoint slides]. Retrieved from [http://www.vtcampuscompact.org/2009/TCL\\_post/presenter\\_powerpoints/Christine%20Cress%20-%20Curricular%20Strategies.ppt](http://www.vtcampuscompact.org/2009/TCL_post/presenter_powerpoints/Christine%20Cress%20-%20Curricular%20Strategies.ppt)

## Web pages

### ❖ *Web pages and non-periodical documents on the Internet*

Library and Archives Canada. (2008). *Celebrating women's achievements: Women artists in Canada*. Retrieved from <http://www.collectionscanada.gc.ca/women/002026-500-e.html>

Geography of Canada. (2009, September 29). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved September 30, 2009, from [http://en.wikipedia.org/wiki/Geography\\_of\\_Canada](http://en.wikipedia.org/wiki/Geography_of_Canada)

## 5. Note

Please avoid using footnotes. Change footnotes to endnotes. Insert "(Note 1, Note 2)" in the running text and explain the note in an end notes section after the references page. Please see the template (<http://ccsenet.org/web/submissionguide>) for examples.

## 6. Appendix

The appendix comes after the references and the notes. In the text, refer to appendices by their labels: e.g., produced the same results for both studies (see Appendices A and B for complete proofs). Please see the template ([www.ccsenet.org/submission](http://www.ccsenet.org/submission)) for examples.