

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS TÉCNICOS DO PROCESSO DE
FABRICAÇÃO DE AGUARDENTE A PARTIR DE GENGIBRE**

LÍVIA MARIA TORRES

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de mestre em Agronomia – Área de
Concentração em Energia na Agricultura.

BOTUCATU - SP

(Agosto/2009)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS TÉCNICOS DO PROCESSO DE
FABRICAÇÃO DE AGUARDENTE A PARTIR DE GENGIBRE**

LÍVIA MARIA TORRES

Orientadora: Prof. Dra. Magali Leonel

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Agronomia – Área de Concentração em Energia na Agricultura.

BOTUCATU - SP

(Agosto/2009)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - JCA - RAGNARO - BOTUCATU (SP)

Torres, Livia Maria. 1982-
T693c Caracterização dos parâmetros léxicos do processo de fabricação do aguardente a partir do canquibre / Livia Maria Torres. - Botucatu : [s.n.], 2009.
xii, 106 f. il., quísts., tabs.
Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Magali Leonel
Inclui bibliografia
1. Canquibre. 2. Amido. 3. Hidrólise. 4. Fermentação. I. Leonel, Magali. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS TÉCNICOS DO PROCESSO
DE FABRICAÇÃO DE AGUARDENTE A PARTIR DE GENGIBRE"

ALUNA: LÍVIA MARIA TORRES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MAGALI LEONEL

Aprovado pela Comissão Examinadora


PROFA. DRA. MAGALI LEONEL


PROF. DR. MANOEL LIMA DE MENEZES


PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

Data da Realização: 12 de agosto de 2009.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Magali Leonel pela orientação do trabalho;

À Profa. Dra. Marta Mischan pela realização das análises estatísticas;

À Novo Nordisk pelo fornecimento das enzimas do processo;

Ao Luiz, técnico do Laboratório de Análises do CERAT/UNESP pela ajuda na caracterização da matéria prima e realização de análises de cromatografia (CLAE);

Ao Douglas e Sérgio, técnicos do Laboratório de Matérias-primas do CERAT/UNESP pela ajuda na moagem dos rizomas de gengibre;

A todos os funcionários da pós-graduação pela atenção;

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado;

Às minhas amigas Daniela, Ângela, Eloneida, Ileana, que me apoiaram nos momentos difíceis, obrigada pela compreensão e pelos momentos alegres...

Aos meus pais que me apoiaram e se dedicaram ao meu projeto e que me deram amor e carinho;

Ao meu marido Leonardo pela compreensão e colaboração;

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE APÊNDICES.....	XII
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1 INTRODUÇÃO.....	05
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1 Gengibre.....	09
2.2 Álcool de amiláceo.....	12
2.2.1 Amido.....	12
2.2.2 Hidrólise de Amido.....	17
2.2.3 Enzimas amilolíticas comerciais no Brasil.....	20
2.2.3.1 Termamyl.....	20
2.2.3.2 Liquozyme.....	21
2.2.3.3 AMG.....	21
2.2.4 Fermentação.....	22
2.2.5 Destilação.....	25
2.2.6 Decreto sobre bebidas alcoólicas.....	26
2.2.6.1 Dos destilados alcoólicos.....	27
2.2.6.2 Das aguardentes.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Matéria-prima.....	30
3.2 Caracterização físico-química dos rizomas de gengibre.....	30
3.2.1 Preparo da Amostra.....	30
3.2.1.1 Umidade.....	31
3.2.2 Cinzas.....	31
3.2.3 Proteínas.....	31
3.2.4 Matéria graxa.....	31
3.2.5 Açúcares totais.....	31

3.2.6 Fibras.....	32
3.2.7 Amido.....	32
3.2.8 pH.....	33
3.2.9 Acidez titulável	33
3.3 Primeiro Ensaio.....	34
3.3.1 Análise do hidrolisado	36
3.3.2 Cálculo do rendimento de processo	36
3.3.3 Análise dos dados.....	36
3.4 Segundo Ensaio.....	37
3.4.1 Delineamento experimental	37
3.4.2 Processo de hidrólise-sacarificação	38
3.4.3 Análise dos hidrolisados.....	39
3.4.4 Análise dos dados.....	40
3.5 Terceiro Ensaio	42
3.5.1 Preparo do mosto	42
3.5.2 Delineamento experimental	42
3.5.3 Análise do vinho	43
3.5.3.1 Contagem das células.....	43
3.5.3.2 Açúcares residuais, etanol, metanol e glicerol.....	44
3.5.3.3 Perfil cromatográfico dos componentes voláteis do destilado.....	44
3.5.4 Análise dos dados	45
3.6 Quarto Ensaio	46
3.6.1 Preparo do hidrolisado.....	47
3.6.2 Fermentação.....	48
3.6.3 Destilação.....	48
3.6.4 Caracterização das frações destiladas e da vinhaça	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 Primeiro ensaio	52
4.1.1 Caracterização dos hidrolisados.....	53
4.1.2 Rendimento de processo	57
4.2 Segundo ensaio	58

4.2.1 Glicose	58
4.2.2 Dextrina.....	61
4.2.3 Rendimento de processo	63
4.3 Terceiro ensaio.....	64
4.3.1 Análises do vinho.....	65
4.3.1.1 Etanol	65
4.3.1.2 Glicerol	68
4.3.1.3 Metanol	69
4.3.1.4 Sacarose	71
4.3.1.5 Maltose.....	72
4.3.1.6 Glicose	75
4.3.1.7 Crescimento celular	77
4.3.2 Análise do destilado.....	79
4.3.2.1 Etanol.....	79
4.3.2.2 Metanol	83
4.4 Quarto ensaio	84
4.4.1 Análise hidrolisado	84
4.4.2 Análise do destilado.....	85
5 CONCLUSÕES	89
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Composição química dos rizomas de gengibre.....	11
Tabela 2 Parâmetros variáveis do processo de hidrólise-sacarificação	38
Tabela 3 Delineamento experimental do segundo ensaio.....	41
Tabela 4 Variáveis de trabalho com seus respectivos níveis do terceiro ensaio.....	43
Tabela 5 Delineamento experimental do terceiro ensaio.....	46
Tabela 6 Composição centesimal média dos rizomas de gengibre tipo caipira adquiridos em Tapiraí – SP	52
Tabela 7 Médias e análise de variância para a comparação do teor de glicose nos hidrolisados obtidos a partir da ação das duas α -amilases	53
Tabela 8 Médias e análise de variância para a comparação do teor de glicose nos hidrolisados obtidos após a liquefação pelas duas α -amilases, nos diferentes tempos de ação da AMG 300L	54
Tabela 9 Resultado dos valores de glicose (g/L) e dextrina (g/L) encontrados no hidrolisado de gengibre em cada tratamento e rendimento do processo (%)	59
Tabela 10 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose (g L^{-1}) nos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado)	60
Tabela 11 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado)	61
Tabela 12 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o rendimento do processo (%) dos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado).....	63
Tabela 13 Resultado da análise em HPLC do vinho fermentado de gengibre para valores de glicose inicial, final, etanol, metanol, glicerol, sacarose, maltose e outros açúcares	66
Tabela 14 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de etanol no vinho (modelo ajustado)	67
Tabela 15 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicerol no vinho (modelo ajustado)	68
Tabela 16 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho (modelo ajustado)	70

Tabela 17 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de sacarose no vinho (modelo ajustado)	71
Tabela 18 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de maltose no vinho (modelo ajustado)	74
Tabela 19 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose no vinho (modelo ajustado)	76
Tabela 20 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o crescimento celular no vinho (modelo ajustado)	78
Tabela 21 Resultado dos valores de etanol, metanol e acetona em porcentagem encontrados no destilado de gengibre em cada tratamento	80
Tabela 22 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de etanol no destilado (modelo ajustado)	80
Tabela 23 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de metanol no destilado (modelo ajustado)	83
Tabela 24 Resultados médios das análises no hidrolisado de gengibre.....	85
Tabela 25 Resultados médios das análises no vinho de gengibre.....	86
Tabela 26 Valores médios dos componentes químicos das frações destiladas do vinho de gengibre	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Raiz de gengibre (a) e flor de gengibre (b). Fonte: Embrapa, 2008.....	10
Figura 2 Fotomicrografia de grânulos de amido de gengibre observados em microscópio eletrônico de varredura (aumento 1440x). Fonte: Leonel et al, 2005	13
Figura 3 Grânulo de amido, revelando as camadas de deposição concêntricas em volta do <i>hilum</i> . Fonte: Simbiótica, 2008.....	13
Figura 4 Estrutura molecular da amilose (a) e da amilopectina (b). Fonte: Thomas; Atwell (1999).....	14
Figura 5 Perfil viscoamilográfico (RVA) do amido de gengibre (2,5g amido/25ml). Fonte: Leonel et al, 2005.....	16
Figura 6 Processo de hidrólise-sacarificação das suspensões de gengibre	35
Figura 7 Reator utilizado no processo de hidrólise da suspensão de gengibre.....	40
Figura 8 Filtro a vácuo utilizado para separar o extrato líquido das fibras após o processo de hidrólise dos rizomas de gengibre	47
Figura 9 Alambique de cobre utilizado na destilação do vinho fermentado de gengibre.....	49
Figura 10 Perfil dos açúcares nos hidrolisados após ação das α -amilases.....	55
Figura 11 Efeito do tempo de ação da AMG 300L no teor de glicose após a ação das duas α -amilases.....	56
Figura 12 Balanço de massa do processo de hidrólise-sacarificação do rizoma de gengibre nos diferentes tratamentos	57
Figura 13 Efeito das concentrações de Termamyl 2X e AMG 300L sobre o teor de glicose nos hidrolisados de gengibre	60
Figura 14 Efeito da concentração de AMG 300L sobre o teor de dextrina no hidrolisado de gengibre	62
Figura 15 Efeito da concentração de Termamyl 2X e AMG 300L sobre o rendimento do processo de hidrólise-sacarificação de suspensão de gengibre.....	64
Figura 16 Efeito da temperatura sobre quantidade de etanol produzida no vinho.....	67
Figura 17 Efeito do tempo de fermentação sobre quantidade de glicerol no vinho	69
Figura 18 Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de metanol no vinho, com a concentração de levedura em 1,5%.....	70

Figura 19 Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de sacarose no vinho, com concentração de levedura de 1,5%.....	72
Figura 20 Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de sacarose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas	73
Figura 21 Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de maltose no vinho, com a concentração de levedura em 1,5%.....	74
Figura 22 Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de maltose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas	75
Figura 23 Efeito do tempo sobre a concentração de glicose no vinho.....	76
Figura 24 Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de glicose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas	77
Figura 25 Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o crescimento celular no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas	78
Figura 26 Efeito da concentração de levedura e tempo de fermentação sobre a porcentagem de etanol no destilado, com a temperatura de fermentação de 30°C	81
Figura 27 Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre a porcentagem de etanol no destilado, com a concentração de levedura de 1,5%.....	82
Figura 28 Efeito do tempo de fermentação sobre a porcentagem de metanol no destilado.....	84

LISTA DE APÊNDICES**Página**

Apêndice 1 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose (g L^{-1}) nos hidrolisados de gengibre.....	101
Apêndice 2 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre.....	101
Apêndice 3 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre.....	102
Apêndice 4 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de etanol no vinho.....	102
Apêndice 5 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicerol no vinho.....	103
Apêndice 6 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho.....	103
Apêndice 7 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de sacarose no vinho.....	104
Apêndice 8 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de maltose no vinho.....	104
Apêndice 9 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose no vinho.....	105
Apêndice 10 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para crescimento celular no vinho.....	105
Apêndice 11 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de etanol no destilado.....	106
Apêndice 12 Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de metanol no destilado.....	106

RESUMO

O rizoma de gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na medicina popular, na alimentação, industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geléias. Frente ao conteúdo de amido presente neste rizoma, uma possibilidade de incremento da cadeia produtiva do gengibre seria a produção de bebida destilada, a qual poderia ser obtida a partir de rizomas de baixa qualidade para exportação e/ou a partir do resíduo da extração dos óleos essenciais por indústrias processadoras deste rizoma. Este trabalho teve por objetivo geral a avaliação dos parâmetros técnicos do processamento de gengibre para produção de aguardente e, como objetivos específicos: caracterizar a composição centesimal dos rizomas de gengibre; avaliar a influência de alguns parâmetros dos processos de hidrólise e fermentação no rendimento em açúcares e etanol; e caracterizar o destilado quanto aos parâmetros de qualidade para aguardente. O trabalho foi dividido em quatro experimentos. O primeiro experimento objetivou comparar o efeito de duas α -amilases na etapa de liquefação, bem como, a influência do tempo de ação da amiloglicosidase na etapa de sacarificação, sobre o perfil de açúcares e rendimento do processo. O segundo experimento objetivou estabelecer qual a melhor concentração enzimática para o processo de hidrólise e sacarificação. O terceiro experimento teve por objetivo verificar o efeito do tempo de fermentação, concentração de levedura e temperatura de fermentação sobre o perfil cromatográfico do vinho obtido. A partir

das conclusões parciais dos experimentos anteriores foi realizado o quarto ensaio que teve por objetivo produzir e caracterizar a aguardente de gengibre. Os resultados obtidos mostraram que a enzima Termamyl 2X é mais eficiente no processo de liquefação da suspensão de gengibre; o tratamento com 1,6 kg de Termamyl 2X/ton de amido e 3,0 L de AMG 300L/ton de amido foi o mais eficiente na liquefação e sacarificação do amido; o tempo de fermentação, concentração de levedura e temperatura de fermentação adequados ao processo de fermentação de hidrolisado de gengibre foram de 20 horas, 1,5% e 26°C respectivamente. A aguardente de gengibre apresentou teor de metanol acima do permitido pela legislação brasileira, mas sua composição foi semelhante á relatada na literatura para outras aguardentes produzidas a partir de diferentes matérias-primas.

Palavras-chave: Hidrólise, amido, fermentação.

CHARACTERIZATION OF TECHNICAL PARAMETERS OF THE PROCESS OF MANUFACTURE OF BRANDY FROM GINGER

. Botucatu, 2009. 109p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LÍVIA MARIA TORRES

Adviser: MAGALI LEONEL

SUMMARY

The rhizome of ginger is widely marketed on the basis of its use in folk medicine, food, industrial, especially as raw material for the manufacture of beverages, perfumes and sugar confectionery such as breads, cakes, cookies and jellies. Facing the content of starch in this rhizome, an opportunity to increase the productive chain of ginger would be the production of distilled drink, which could be obtained from rhizomes of low quality for export and / or from residue from the extraction of oil key industries for processing this rhizome. This study aimed at evaluating the general technical parameters of the processing of ginger for the production of spirits, and as specific objectives: characterization of the proximate composition of the rhizomes of ginger to evaluate the quality and quantity of raw materials needed for the process of hydrolysis -saccharification; evaluate the influence of some parameters of the process of hydrolysis, saccharification and fermentation on yield of sugar and ethanol; and characterize the ginger spirit. The work was divided into four

experiments. The first experiment aimed to compare the effect of two α -amylases in the stage of liquefaction, as well as, the influence of time of amiloglucosidase action in the saccharification step, on the profile of sugars and yield of the process. The second experiment aimed to establish the best concentration enzymes for the process of hydrolysis and saccharification. The third experiment aimed to verify the effect of time of fermentation, the yeast concentration and temperature of fermentation on the chromatographic profile of the wine obtained. The fourth experiment was conducted based on partial findings of previous experiments and aimed to produce and characterize the spirit of ginger. The results showed that the enzyme Termamyl 2X is more efficient in the process of liquefaction of the suspension of ginger, the treatment with 1.6 kg of Termamyl 2X/ton of starch and 3.0 L AMG 300L/ton starch was the most efficient in the liquefaction and saccharification of starch, the time of fermentation, the yeast concentration and temperature of fermentation to the appropriate process of fermentation of ginger hydrolyzate were 20 hours, 1.5% and 26°C respectively. The spirit of ginger showed levels of methanol above as permitted by Brazilian legislation, but its composition was similar to that reported in the literature for other spirits produced from different raw materials.

Keywords: hydrolysis, starch, fermentation.

1 INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta pertencente à família *Zingiberaceae*, que produz um rizoma muito valorizado por seus diversos usos tanto na culinária, como na medicina popular, além da utilização como planta ornamental e nas indústrias de perfumes e bebidas (BLANCO, 1997).

O gengibre é uma das especiarias mais importantes ao redor do mundo. Atualmente é cultivado em áreas tropicais e subtropicais, sendo a Índia responsável por 50% da produção mundial.

A área mundial cultivada com gengibre apresentou variação de 3,7% entre 1999 e 2001, passando de 310.100 ha para 321.732 ha. Já o volume ofertado nesse período mostrou variação positiva maior que a da área (7,7%), com média de 800.775t. A Nigéria destaca-se em nível mundial pela extensão da área cultivada com gengibre, embora em termos de volume produzido seja superada pela Índia e China. O aumento de área ocorrido entre 1999 e 2001 deveu-se, principalmente, à alta demanda doméstica como dos mercados internacionais (HERBS & SPICES, 2007).

A produção mundial de gengibre em 2007 foi de 1,3 milhões de toneladas, sendo a Índia o maior produtor mundial (420 mil toneladas) seguida pela China (285 mil

toneladas), Indonésia (177 mil toneladas), Nepal (158,9 mil toneladas) e Nigéria (138 mil toneladas) (FAO, 2008).

O comércio internacional dos rizomas de gengibre é feito sob três formas básicas: gengibre *in natura*, em conserva ou cristalizado e seco. Do rizoma imaturo, tenro e menos pungente, colhido em torno de 6 meses, é preparada a conserva (em salmoura ou xarope de açúcar) ou o gengibre cristalizado. O gengibre seco é preparado a partir do rizoma colhido após completado o seu estágio de maturação. Este gengibre seco é comercializado em peças íntegras, laminado ou ainda em pó. Esta última forma é utilizada em menor volume dado que o processo de moagem é geralmente realizado no país importador (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997). Registra-se também a comercialização de produtos derivados do gengibre, como o óleo essencial e oleoresina. O óleo essencial é produzido, principalmente, na Índia e na China e, em menor escala, na Austrália, Jamaica e Indonésia (PURSEGLOVE et al., 1981).

O valor mundial do comércio de gengibre chega à cerca de US\$ 185 milhões, excluindo-se o óleo e a oleoresina. Apesar de maior produtor, a participação da Índia neste mercado mundial é pequena, correspondendo a apenas 6%. A China, por sua vez, tem liderado este mercado. Entretanto, no que tange ao comércio de oleoresina e óleo, aproximadamente 50% é proveniente da Índia. Os preços do gengibre no mercado mundial variam grandemente de acordo com a sua origem e limpeza. O preço de importação do gengibre seco geralmente está entre US\$ 700 e US\$ 1350/t (CROP PROFILE, 2003).

No Brasil o gengibre é cultivado na faixa litorânea de Santa Catarina e do Paraná, no Sul do Estado de São Paulo e também no Espírito Santo, que é responsável por metade da produção nacional (JUNQUEIRA et al., 1999).

O Brasil se inclui entre os pequenos produtores de gengibre, cuja produção é orientada para exportação. A quantidade de rizomas destinada à exportação representa 70 a 80% da colheita, havendo uma perda de 20 a 30% por ocasião do beneficiamento, para os rizomas que não atingem qualidade para exportação (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997).

De acordo com a FAO, citada nos estudos de Herbs & Spices (2003), o prognóstico do agronegócio gengibre é promissor, em função do aumento da área, produção e produtividade nos principais países produtores. Neste contexto está incluso o Brasil.

Negrelle et al. (2005), analisando o agronegócio do gengibre no estado do Paraná, relatam aspectos relacionados à comercialização como fatores interferentes para a expansão do negócio. Dentre os principais estão a deficiência de contratos entre agricultor e comprador externo, a concorrência com os preços ofertados pela China e a elevada porcentagem de produtos com baixa qualidade para exportação.

Diante destes aspectos, pesquisas que visem o aproveitamento dos rizomas de baixa qualidade como matéria-prima para produtos de elevado valor agregado têm obtido grande interesse dos produtores.

Leonel et al. (2005) verificaram a composição química de rizomas de gengibre do tipo caipira, cultivados em Botucatu-SP, e colhidos após seis meses do plantio, observaram rizomas com: 84,37% de umidade, 1,17% de proteína, 0,86% de lipídeos, 0,93% de fibras, 0,96% de cinzas, 11,42% de amido e 0,34% de açúcares.

Frente ao conteúdo de amido presente neste rizoma, uma possibilidade de incremento da cadeia produtiva do gengibre seria a produção de bebida destilada, a qual poderia ser obtida a partir de rizomas de baixa qualidade para exportação e/ou a partir do resíduo da extração dos óleos essenciais por indústrias processadoras deste rizoma.

De acordo com o Decreto nº 4.851 de 2 de outubro de 2003, aguardente de vegetal é a bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida do destilado alcoólico simples de vegetal ou pela destilação do mosto fermentado de vegetal, podendo ser adoçada e envelhecida (ANVISA, 2007).

O consumo médio anual de aguardente de cana, por habitante, no Brasil, cresceu de 4,4 litros, em 1970, para 8,7 litros, em 1985, e para 11 litros, em 2001 (SEBRAE-MG, 2001).

Segundo SEBRAE-MG (2001), o Brasil é um dos maiores mercados mundiais de destilados, superando tradicionais países consumidores, como Alemanha, Hungria e Polônia, que apresentam consumo entre 9 e 10 litros/habitante/ano.

Atualmente, o mercado mundial e também o brasileiro, de melhor poder aquisitivo, está ávido por produtos denominados “naturais”. O produto artesanal tem mais apelo comercial, permitindo ao micro, pequeno e médio produtor, a chance na

competição com o chamado “produto industrial”, sendo imprescindível para isso a qualidade de seu produto.

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

Portanto, para a viabilização do processamento do gengibre para obtenção de bebida destilada são necessários estudos que avaliem os aspectos técnicos do processo, visando à transferência dos resultados para agricultores e indústrias processadoras.

Este trabalho teve por objetivo avaliar as etapas do processamento de gengibre para fabricação de aguardente. Para isso, foram realizados quatro ensaios nos quais permitissem o estudo da composição centesimal da matéria prima; determinação de qual enzima α -amilase e concentração resultariam melhor rendimento no processo de hidrólise; melhores condições de fermentação quanto à temperatura, tempo e concentração de levedura para produção da aguardente e por fim caracterizar a bebida produzida compará-las com aguardentes existentes no mercado e verificar se seus componentes encontram-se dentro da legislação vigente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), planta da família Zingiberaceae, é originário do sudoeste asiático. É uma planta herbácea, perene, de rizoma articulado, septante, carnoso, revestido de epiderme rugosa e de cor pardenta. Na parte superior apresenta pequenos tubérculos anelados resultantes da base de antigos caules aéreos. Na parte inferior possui muitas raízes adventícias, cilíndricas, carnosas e de cor brancacentas. Os caules são eretos, formados por muitas folhas dísticas, sendo as basilares simples com bainhas glabras e estriadas no sentido longitudinal (Figura 1a e 1b). O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Externamente, sua coloração vai do amarelo couro à marrom brilhante, estriado na longitudinal, algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos” que surgem obliquamente dos rizomas; achatadas, obovaladas, curtas, de 1 a 3 cm de comprimento (ELPO & NEGRELLE, 2004).

O gengibre é comercializado internacionalmente, na forma seco, além dos rizomas, sob a forma de produtos derivados, tais como o óleo essencial e a oleoresina. O óleo essencial contém componentes voláteis responsáveis pelo aroma, enquanto a oleoresina contém além dos constituintes voláteis aromáticos, os componentes não voláteis, responsáveis pela pungência característica do gengibre (TAVEIRA *et al*, 1997). É usado nas indústrias de

alimentos, de bebidas, farmacêutica e de perfumaria. O gengibre também é usado como agente imunestimulante em peixes (SÜHEYLA *et al*, 2003), tem efeitos antiemético e anti-pirético (HORI *et al*, 2003), anti-inflamatório e anti-trombótico (THOMSON *et al*, 2002).



Figura 1 – Rizoma de gengibre (a) e flor de gengibre (b). Fonte: Embrapa, 2008.

O rizoma de gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na medicina popular (excitante, estomacal e carminativo), na alimentação, industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geléias (CORRÊA JUNIOR *et al.*, 1994; TROPICAL, 2007; INFORMAÇÕES, 2008). Várias propriedades do gengibre foram comprovadas em experimentos científicos, citando-se as atividades antiinflamatórias, antiemética e antinausea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (YOSHIKAWA *et al.*, 1994; ONTENGCO *et al.*, 1995; LONIEWSKI *et al.*, 1998; WHO, 1999; UTPALENDU *et al.*, 1999).

Incluído no grupo "especiarias", o gengibre ocupa atualmente o 3º lugar das plantas medicinais, aromáticas e condimentares mais produzidas no Paraná (PARANÁ, 2003). Apesar desta importância econômica no contexto regional, há carência de informações sistematizadas sobre esta cadeia produtiva, em especial, no que se refere ao sistema operacional de comercialização, que de acordo com as queixas dos produtores, tem causado prejuízos ao agronegócio gengibre.

O gengibre tem sido utilizado no oriente há mais de 2.000 anos, havendo referências de que nos séculos XII a XIV era tão popular na Europa quanto à pimenta-do-reino. Antes do descobrimento da América já era largamente utilizado pelos árabes, como expectorante e afrodisíaco, sendo difundido por toda a Ásia tropical, da China à Índia. Foi introduzido na América logo após o descobrimento, sendo que os primeiros relatos comentam que inicialmente foi cultivado no México, sendo em seguida levado às Antilhas, principalmente à Jamaica, a qual no ano de 1.547 chegou a exportar cerca de 1.100 t para a Europa (LISSA, 1996).

No Brasil, acredita-se que a introdução do gengibre deu-se durante a invasão holandesa, em função da permuta de plantas econômicas existentes entre os dois países naquela época (LISSA, 1996). Esta cultura iniciou-se no Rio de Janeiro, espalhando-se para São Paulo, Paraná e, mais recentemente, para Santa Catarina (SANTOS, 2000), principalmente nas regiões litorâneas.

Taveira et al. (1997) analisando dois tipos de gengibre cultivados no Brasil observaram a composição química média descrita na Tabela 1, o que mostra elevado teor de umidade e, teor considerável de carboidratos totais, na matéria seca.

Tabela 1: Composição química dos rizomas de gengibre.

Componentes	Tipo Gigante	Tipo Caipira
Umidade (%)	80-85	80-90
(g/100g de matéria seca)		
Carboidrato total	78,5-81,6	76,3-84,8
Proteína	7,2-7,7	5,6-13,8
Extrato Etéreo	3,6-7,3	3,6-8,4
Fibra Total	9,6-16,2	5,5-11,7
Cinzas	6,9-7,1	4,3-8,0
Extrato alcoólico	5,4-8,1	1,7-8,0
Extrato Volátil	1,5-2,6	0,4-2,7
Extrato não-volátil	2,1-4,7	2,0-6,0

Fonte: Taveira et al. (1997).

2.2 Álcool de amiláceo

2.2.1 Amido

O amido, polissacarídeo abundante no reino vegetal, pode ser utilizado como complemento e/ou alternativa à sacarose da cana-de-açúcar para a produção do etanol. O emprego de amido, como complemento e/ou alternativa à sacarose, pode levar o desenvolvimento agroindustrial a várias regiões brasileiras que têm tradição no cultivo de amiláceos (MENEZES, 1980)

O amido é produto final do processo fotossintético e constitui reserva de carbono nas plantas. Sua formação ocorre devido à atividade combinatória de algumas enzimas, tanto nas organelas fotossinteticamente ativas, onde o amido é reserva temporária, quanto nos amiloplastos de órgãos de reserva (FRANCO et al., 2001).

O amido armazenado nas células de sementes, raízes, tubérculos, acha-se depositado na forma de grânulos mais ou menos brilhantes, apresentando formas e dimensões diversas. A estrutura do grânulo de amido está intimamente ligada ao seu desenvolvimento na célula viva. Nas células vegetais, os grânulos são formados dentro de estruturas especiais denominadas amiloplastos, envolvidos por uma matriz protéica, o estroma (FRANCO et al., 2001).

O tamanho e a forma de grânulos de amido estão entre os fatores de importância na determinação de usos potenciais de amidos. Com relação ao amido do gengibre, Leonel et al. (2005) observaram grânulos de amido com formas circulares e ovaladas, achatadas, com tamanho variável. A amplitude de variação de diâmetros maiores dos grânulos de amido foi de 9,6 a 26,4 μ m e diâmetros menores de 7,7 μ m a 24,9 μ m, com média de 14,5 μ m. As distribuições de freqüências de diâmetros mostraram uma maior variação no diâmetro maior devido às formas observadas, com maior freqüência de grânulos com diâmetro maior (14 a 16 μ m) (Figura 2).

O grânulo de amido é birrefringente, e sob luz polarizada, apresenta uma típica cruz de Malta, que pode ser cêntrica ou excêntrica. Entretanto, a birrefringência não implica necessariamente em uma forma cristalina e sim num alto grau de organização

molecular nos grânulos (Zobel, 1988). Estes são compostos por camadas diversas que se superpõe ao redor de um núcleo chamado *hilum*, que pode estar no centro do grânulo ou deslocado lateralmente (Figura 3) (Van der Burgt et al., 2000). De acordo com Schoch & Maywald (1956) a posição do *hilum* é usada como informação para identificação do material vegetal de origem.

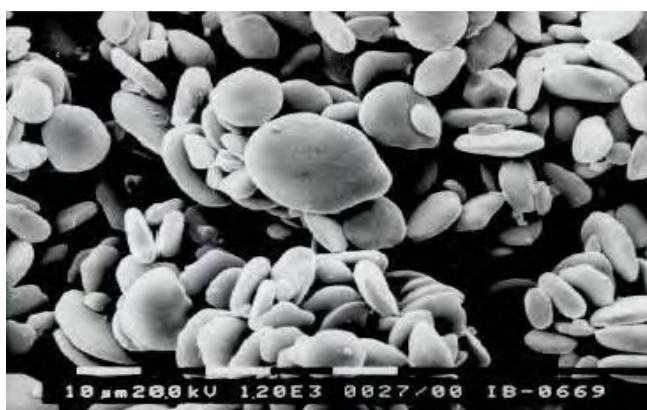


Figura 2 – Fotomicrografia de grânulos de amido de gengibre observados em microscópio eletrônico de varredura (aumento 1440x). Fonte: Leonel et al (2005).

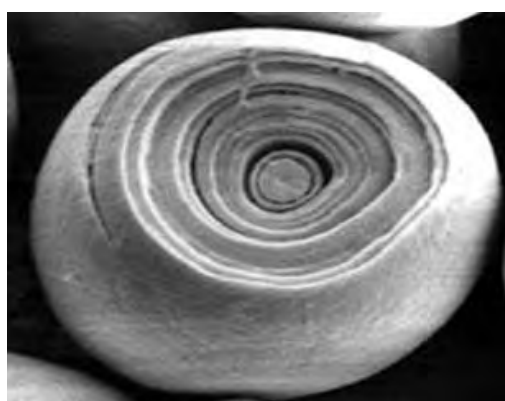


Figura 3 – Grânulo de amido, revelando as camadas de deposição concêntricas em volta do *hilum*. Fonte: Simbiótica (2008).

De acordo com Biliaderis (1991), são as áreas cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e os tornam mais ou menos resistentes aos ataques químicos e enzimáticos. A fase gel ou zona amorfa dos grânulos é a região que é menos densa, mais suscetível aos ataques enzimáticos e absorve mais água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização. Segundo esse autor não existe uma demarcação forte entre regiões cristalina e amorfa. Há evidências da existência de uma estrutura supramolecular onde as fases amorfa e cristalina são independentes.

As moléculas do amido formam pontes ou ligações de hidrogênio, pois estão associadas paralelamente, o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas ou micelares. Quanto à sua estrutura química, o amido é composto por resíduos de alfa-D-glucose, formando dois tipos de macromoléculas, a amilose e a amilopectina (Figura 4a e 4b) (FRANCO et al., 2001).

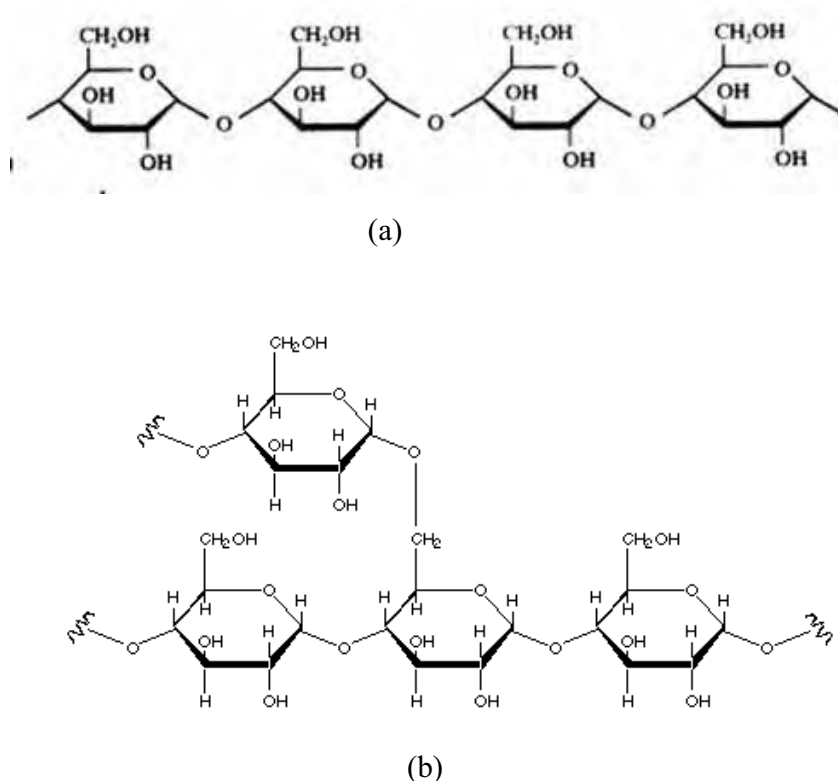


Figura 4 – Estrutura molecular da amilose (a) e da amilopectina (b). Fonte: Thomas; Atwell (1999).

O amido é um hidratado de carbono, composto por carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção de 6:10:5 de forma geral ($C_6H_{10}O_5$). As unidades de glicose estão ligadas entre si pelo C_1 e C_4 através de oxigênio, formando uma ligação glicídica (Whister e Daniel, 1984). O amido é composto principalmente de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído em torno de 6.000 unidades de glicose, conectadas por ligação α (1,4). Seu grau de polimerização depende da fonte do amido.

A amilose apresenta a propriedade de absorver até 25 vezes seu peso em água. A amilopectina, de cada 20 a 30 moléculas de glicose ocorre um ponto de ramificação. Essa característica a torna menos susceptível à ação de algumas enzimas do que a amilose, o que é um fator importante para explicar a ação de enzimas sobre o amido e sua aplicação em processos industriais (FRANCO et al., 2001).

Os teores de amilose e amilopectina variam com a fonte botânica. Quanto ao teor de amilose em amido de gengibre, Leonel et al. (2005) observaram 20,38% de amilose, valor próximo aos 22,2% encontrados por Reyes et al. (1982) para amido deste mesmo vegetal e inferior aos 28,2% observados por Peroni (2003). A variabilidade nos resultados encontrados na literatura pode decorrer do uso de diferentes metodologias e também de fatores como variedade e idade da planta.

O fenômeno de gelatinização ou gelificação do amido é extremamente importante para vários sistemas alimentícios. Grânulos de amido nativos são insolúveis em água abaixo de sua temperatura de gelificação. Eles expandem um pouco em água fria (10-20%), devido à difusão e absorção de água dentro das regiões amorfas, entretanto, esta expansão é reversível pela secagem (Biliaderis, 1991). De acordo com Morrison (1995), nas zonas amorfas os componentes que expandem são amilose e um pouco de amilopectina. Essa expansão é limitada por ser severamente restringida pelas camadas essencialmente contínuas de amilopectina cristalina. Este autor considera que esse grau de expansão seja reversível porque as camadas cristalinas não são perturbadas.

Na presença de água e calor os grânulos de amido expandem-se embebendo água. Com o aquecimento, a temperatura de gelatinização é atingida e uma pasta é formada. As propriedades da pasta do amido de gengibre, avaliadas pelo Rápido Visco Analisador por Leonel et al (2005), mostraram temperatura de pasta (91,1°C), muito superior

às observadas em amido de outras tuberosas como a batata (64,8°C) e a mandioca (66,7°C) (LEONEL et al., 2002).

O pico de viscosidade em dada concentração é uma característica importante que distingue amidos de diferentes espécies. A viscosidade máxima do amido de gengibre encontrada por Leonel et al (2005) foi de 76,9 RVU muito próxima à observada por Peroni (2003) que foi 78RVU (Figura 5). O pico de viscosidade desse amido pode ser considerado bastante inferior aos encontrados em amidos de outras tuberosas amiláceas como a mandioca (247,8RVU) e a batata (753,6RVU) no trabalho de Leonel et al. (2002).

A quebra de viscosidade do amido de gengibre foi próxima de zero, evidenciando elevada estabilidade térmica e mecânica, ou seja, em temperaturas elevadas e sob agitação mecânica os grânulos deste amido resistem à quebra e, portanto, à redução de viscosidade (LEONEL et al, 2005). Vieira (2004) também observou quebra de viscosidade próxima a zero para amido de gengibre (0,5RVU). Reyes et al. (1982) atribuíram esta elevada resistência do amido de gengibre à presença de forças de ligações homogêneas e a um elevado grau de associação entre os componentes deste amido, mantendo a estrutura granular.

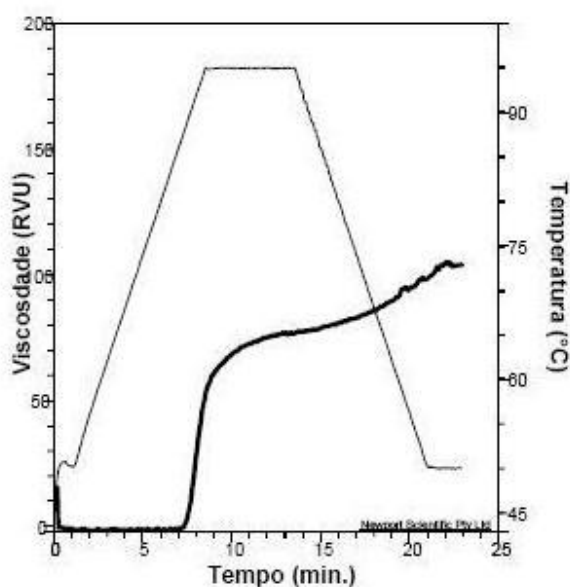


Figura 5 – Perfil viscoamilográfico (RVA) do amido de gengibre (2,5g amido/25ml). Fonte: Leonel et al, 2005.

2.2.2 Hidrólise do amido

O amido não é diretamente fermentável necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose. A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática. A primeira apresenta algumas desvantagens tais como: elevado consumo de energia, baixo rendimento e seletividade e pouca flexibilidade operacional. Em função disso, os processos enzimáticos assumiram maior importância, pois conseguiram eliminar quase que totalmente essas desvantagens.

Os produtos de conversão enzimática do amido vão de dextrinas de peso molecular elevado à glicose. A matéria-prima para obtenção dos hidrolisados é o amido, polissacarídeo constituído de cadeias retas e ramificadas onde cada molécula é formada de várias centenas de unidades de glicose, ligadas entre si. A hidrólise da molécula de amido quebra essas ligações progressivamente gerando cadeias mais curtas de dextrinas; maltose e glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas (ZANIM et al, 2000).

A hidrólise química é catalisada pela ação de ácidos. Industrialmente é mais comum o uso de HCl ou de H₂SO₄. Essa reação é conduzida em quantidade suficiente de água e é acelerada sob pressão e com o aumento da temperatura do processo (ZANIM et al., 2000).

A hidrólise enzimática tem sido muito utilizada pelas indústrias na produção de álcool de amiláceos. Uma das características mais importantes da catálise enzimática é sua especificidade, muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato.

Além do amido, as enzimas são os agentes mais importantes nas reações de hidrólise. Aquelas usadas no processo de hidrólise também chamadas de diástases, ou enzimas amilolíticas. São compostos de natureza protéica que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica (CHAPLIN E BUCKE, 1990).

Algumas enzimas são haloproteínas, constituídas somente de uma cadeia de aminoácidos enquanto que outras são heteroproteínas, contendo uma parte não

protéica. Essa parte não protéica é o co-fator, que pode ser inorgânico como um metal ou orgânico como uma coenzima (LEHNINGER, 1985).

As enzimas permitem também alcançar rapidamente o estado de equilíbrio da reação, por diminuir a energia de ativação e aumentar assim a velocidade. As enzimas não sofrem modificação durante a reação e ao final de cada ciclo voltam a apresentar a mesma atividade (LEHNINGER, 1985).

A hidrólise do amido se dá por desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina, que, ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente glicose. O amido não tem sabor, mas os produtos de uma hidrólise intensa apresentam sabor adocicado (FRANCO et al., 2001).

As amilases são enzimas que atuam hidrolisando cadeias de amido, sendo que as α , β e glucoamilases quebram as ligações glicosídicas α -1,4, enquanto as pululanases e isoamilase atuam nas ligações α -1-6 (EL-DASH et al., 1982; OBEL, 2001).

As α -amilases hidrolisam a cadeia de amido, produzindo dextrinas, que podem ser hidrolisadas pelas β -amilases em maltoses ou em glicose pelas amiloglucosidas. As moléculas de maltose são fermentadas mais lentamente que as moléculas de glicose (KRUGER et. al., 1987).

A α -amilase age rapidamente no amido gelatinizado, liberando seus açúcares, que servirão de substrato para as leveduras durante a fermentação (EL-DASH et al., 1982).

As α -amilases fúngicas são utilizadas em panificação e em rações como auxiliar de digestão. Podem ser enzimas termoestáveis, atuando na faixa de 55°C e em pH ácidos (5,0 a 5,5). Já a α -amilase bacteriana é utilizada na liquefação do amido, na produção de xaropes, bebidas, produção de álcool, em indústria têxtil, detergentes, entre outras aplicações. As de uso industrial são termoestáveis, com atuação na faixa de 90 a 110°C e pH 6,0.

Todas as α -amilases são cálcio-metaloenzimas havendo no mínimo um átomo deste metal por molécula. Em presença de cálcio, as α -amilases são mais resistentes a valores extremos de pH, temperatura, tratamento com uréia e ao ataque de enzimas proteolíticas (GRAEL & MENEZES, 1989).

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α - 1,4 e α - 1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (FUJII *et al.*, 1988; OBEL, 2001).

As principais aplicações das amiloglucosidases estão no processo de panificação, produção de xaropes e álcool. Estas enzimas são termoestáveis (55 - 60°C) em soluções acidificadas (pH 4,0 - 5,5) (PIMENTEL, 1987).

A ação sinérgica da α -amilase e da amiloglucosidase no processo de hidrólise vem sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens. Monma *et al.* (1989), estudaram a eficiência do uso destas duas enzimas em grânulos de amido de arroz, sagu e batata e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos.

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. Como o amido é uma estrutura rígida, inicia-se o processo com a gelatinização, visando facilitar a ação enzimática, o que reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade final de produtos (TAFFARELLO, 2004).

No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gelatinização) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de enzima α -amilase. A temperatura de gelatinização varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gelatinização (BEYNUM *et al.*, 1985).

O aquecimento de uma solução de amido em tais temperaturas resulta no inchaço da região amorfa do grânulo, causando a ruptura das ligações químicas mantenedoras da estrutura ordenada e a abertura da lamela cristalina, tornando o amido altamente hidratado e vulnerável a reações químicas, como a ação das enzimas amilolíticas. Esse primeiro passo é adotado em todos os processos industriais de produção de derivados de amido (TAFFARELLO, 2004).

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada a glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima (β -amilase e glicoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina. O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose (TAFFARELLO, 2004).

2.2.3 Enzimas amilolíticas comerciais no Brasil

As preparações enzimáticas de grau alimentício apresentam-se na forma de um líquido não viscoso, de cor marrom escura. As preparações de enzimas usadas na produção de hidrolisados podem ser divididas em três categorias, devido às características das preparações:

- α -amilase termorresistente, com temperatura ótima de ação é 90°C;
- α -amilase termosensível, com temperatura ótima de ação entre 70 a 80°C;
- Enzimas de sacarificação de tipo amiloglicosidase e β -amilase.

Apesar das tentativas de padronização internacional, a atividade das preparações é específica de cada produtor ou comerciante. As unidades exigem substratos, temperaturas e pH diferentes, dificultando a comparação das atividades a partir das fichas técnicas dos produtos.

Em condições fora dos parâmetros ótimos, as atividades das preparações enzimáticas e por conseqüência o perfil de hidrólise, mudam totalmente.

A Novozymes A/S é a maior produtora de enzimas em nível mundial e possui uma filial no Brasil. Produz uma gama completa de catalisadores.

2.2.3.1 Termamyl

É um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de α -amilase termo-estável, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformes*. A

enzima hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, convertendo rapidamente o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis.

A Termamyl foi especificamente desenvolvida para promover a liquefação (dextrinização) do amido e produção de maltodextrinas. Possui aparência líquida não viscosa de cor marrom escuro e densidade de 1,2 g/mL. O pH ótimo de ação enzimática está entre 6 e 8 e temperatura de 90 a 105°C, devendo-se adicionar no meio de reação de 30 a 60 mg/Kg de cálcio a fim de otimizar a atividade da enzima (NOVOZYMES, 2008).

2.2.3.2 Liquozyme

A enzima Liquozyme é uma alfa-amilase otimizada para reduzir o comprimento da cadeia de dextrina e a viscosidade do mosto, antes da sacarificação e da fermentação com levedura. É usado na fase de liquefação da produção do etanol, quando é adicionada a viscosa suspensão de amido. A Liquozyme quebra os amidos complexos em cadeias de dextrina menores, reduzindo a viscosidade do mosto, preparando-o para processamento na etapa seguinte (NOVOZYMES, 2008).

2.2.3.3 AMG

A AMG é uma amiloglicosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido liquefeito.

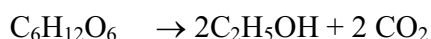
Durante a hidrólise, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A velocidade de hidrólise depende do tipo de ligação e do comprimento da cadeia.

A AMG é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose. Possui aparência líquida não viscosa de cor marrom claro e densidade 1,2 g/mL. O pH ótimo de ação enzimática está entre 4 e 4,5 e temperatura de 58 a 60°C (NOVOZYMES, 2008).

2.2.4 Fermentação

A fermentação alcoólica de açúcares fermentescíveis na presença de leveduras obedece à ordem seqüencial de reações metabólicas da via de Embden - Meyerhof - Parnas (LIMA, 1975).

O fenômeno como um todo pode ser representado pela equação de Gay - Lussac, que serve de base para cálculos de eficiência:



Na realidade há ainda desprendimento de calor e formação de pequena quantidade de produtos secundários, como glicerol, ácido succínico e ácido láctico.

Pela estequiometria, partindo de 1 mol de glicose, 51,1 % seria transformado em álcool e 48,9 % em dióxido de carbono (LIMA,1975).

Muitos são os fatores que exercem efeito significativo sobre o rendimento ou eficiência da fermentação: a qualidade da matéria-prima, as condições fisiológicas do inóculo e fatores ambientais como pH, nível inicial de contaminantes, temperatura, concentração do substrato no mosto, composição nutricional do mosto e concentração do álcool produzido (HORII, 1978).

Na fermentação de matérias-primas amiláceas o processo pode ocorrer simultâneo à etapa de sacarificação ou então se fermenta o extrato obtido após a hidrólise do amido, o qual ocasiona composição de açúcares variável de acordo com a eficiência dos processos de hidrólise e sacarificação.

Srikanta *et al.* (1987), produziram etanol a partir de farelo de mandioca e obtiveram uma eficiência total do processo da ordem de 65,5 % quando fermentaram o xarope, e de 57,3 % quando a fermentação ocorreu simultânea à sacarificação tendo sido o mosto acrescentado de 10 % (v/v) de fermento e suplementado com 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 % KH_2PO_4 e 0,02 % de extrato de levedura ao mosto.

Segundo Lea & Piggott (2003), a fermentação tem três fases distintas: fase preliminar (4h), em que ocorre uma rápida multiplicação celular com baixa produção de CO_2 e pouco aumento da temperatura; fase principal ou turbulenta (12-16h), em que há alta produção de CO_2 e etanol e com atividade celular; e fase final (4-6h), em que há uma redução

na densidade e um aumento na acidez, na quantidade de álcool e temperatura. É comum o reuso das leveduras (10 a 20% volume) separadas do mosto, denominadas de “pé-de-cuba”, após serem tratadas por cerca de 4h com água e ácido sulfúrico.

A fermentação alcoólica é a fase na qual são produzidos os principais componentes químicos da aguardente, sendo que muitos dos quais podem influenciar no aroma e no sabor da bebida, conseqüentemente, na caracterização e na qualidade.

O açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos (BRAGA, 2006).

A habilidade de converter açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de microrganismos, sendo *Saccharomyces cerevisiae*, dentre as leveduras, a que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (SCHWAN & CASTRO, 2001).

As leveduras formam uma das mais importantes subclasses dos fungos. Os fungos, como as bactérias, estão espalhados pela natureza, embora eles vivam normalmente no solo e em regiões de umidade relativa mais baixa que as bactérias. Não são capazes de realizar fotossíntese e raramente formam pseudomicélio.

Estes pequenos seres, estando imersos em um meio contendo carboidratos, só podem conseguir energia degradando moléculas complexas (que contém bastante energia interna) e produzindo moléculas menores (que contém menos energia interna). Desta diferença de energia, porém, apenas uma parcela é aproveitada, pois como em toda transformação real há um desperdício na forma de liberação de calor.

O trabalho de quebrar essas moléculas (açúcares) é feito através de uma série de reações simples, cada uma catalisada por uma enzima, que se situa em regiões determinadas da célula (COPERSUCAR, 1987).

Na fermentação bem sucedida praticamente todo o açúcar é convertido em etanol, contudo, é normal que uma pequena porcentagem seja convertida em outros subprodutos.

Álcoois superiores são importantes componentes para a formação do aroma e sabor de bebidas alcoólicas, porém dificultam a destilação dos vinhos. Os álcoois superiores são conhecidos por apresentarem impacto negativo na qualidade final do vinho. A

formação desses é dependente da temperatura de fermentação, sendo que o aumento desta resulta em aumento da concentração total de álcoois produzidos (CHERUBIN, 1998; BARDI et al., 1997).

Os ésteres constituem a maior classe dos compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas, e são produzidos pelas leveduras durante a fermentação numa reação entre os álcoois produzidos na fermentação e acil-co-enzima A (C_{oa} A), a qual é formada pela ativação do ácido correspondente com auxílio do ATP (PEDDIE, 1990).

Vários fatores influenciam na concentração de ésteres no vinho, como: nível de oxigênio; temperatura, pH de fermentação e linhagem da levedura (BERRY, 2003).

Os ésteres, de modo geral são desejáveis, pois favorecem o aroma da aguardente, sendo oriundos da fermentação, da destilação e do envelhecimento. O acetato de etila que corresponde a cerca de 80% do conteúdo total de ésteres da aguardente, é formado durante a fermentação e na destilação, como produto da reação de esterificação entre álcool etílico e ácido acético, confere odor e gosto desagradável, sendo um dos componentes indesejáveis (HASHIZUME, 1976; BRAGA, 2006).

Os compostos carbonílicos são um dos principais componentes responsáveis pelo flavor das bebidas, particularmente os aldeídos. Geralmente são formados durante a fermentação e são considerados produtos intermediários da rota biossintética de ácidos e álcoois formados através da descarboxilação de alfa-cetoácidos pela ação da piruvato descarboxilase (SUOMALAINEN & LEHTONEM, 1979, BRAGA, 2006).

Nascimento et al. (1997) analisaram aldeídos em 56 aguardentes de cana-de-açúcar e 10 uísques importados e concluíram que as aguardentes comerciais contêm menores concentrações de aldeídos que as artesanais e que, de modo geral, os teores nas aguardentes foram de 12,7mg 100mL⁻¹ de álcool anidro e nos uísques a média de 16,0mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, sendo que o aldeído presente em maior concentração foi o acetaldeído.

Os ácidos orgânicos voláteis são os mais comuns em bebidas destiladas, sendo o ácido acético o mais abundante (ROSE, 1977).

O aquecimento do vinho durante a destilação promove a pirogenação da matéria orgânica presente no vinho, principalmente das hexoses e cetoses, gerando aldeídos

furâncios como o furfural e o hidroximetil-furfural (LEHNINGER et al., 1995). Apesar da elevada toxidez, o furfural e o hidroximetil-furfural geralmente não apresentam problemas por causa das reduzidas concentrações verificadas em aguardentes ($0,148 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ e $0,321 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$, respectivamente) (NASCIMENTO et al., 1997).

O metanol é um constituinte naturalmente presente nas bebidas alcoólicas, em quantidades pequenas em relação aos demais componentes. O metanol é um álcool particularmente indesejável na aguardente. Sua ingestão, mesmo em doses muito pequenas, mas por longos períodos, pode levar á cegueira e a morte (WINDHOLSZ, 1976).

2.2.5 Destilação

Na produção de bebidas alcoólicas destiladas, a destilação separa, seleciona e concentra pelo uso do calor a fração dos compostos voláteis oriundos da fermentação do mosto; assim, a composição das bebidas depende em grande extensão da forma pela qual ela é conduzida.

Segundo Cardoso (2001), a destilação é a operação final na produção de aguardente, que consiste da condensação dos vapores gerados no aquecimento do mosto fermentado (vinho), tendo como produtos finais duas frações líquidas: o destilado rico em etanol e outros componentes e a vinhaça, composta por açúcares não fermentados, ácidos graxos, sais minerais, etc. O vinho com 5 a 8% em volume de álcool deve produzir 15 a 17% do seu volume em aguardente com 38 a 54% em álcool.

De acordo com Faria et al. (2003), a destilação para obtenção de aguardente deve ser fracionada em três partes distintas para retirada de compostos indesejáveis:

- Cabeça: é a primeira fração destilada e contém a maior proporção de compostos mais voláteis, devendo ser separada do produto final;
- Coração: é a segunda fração. Trata-se da aguardente como tal;
- Cauda: é a última fração e, contém como a cabeça, elementos menos voláteis e compostos indesejáveis, devendo ser separada do produto final.

De acordo com Boza e Horri (1999) existem três sistemas de destilação para a produção de aguardente: o contínuo representado pelas colunas ou torres de destilação; o semi-contínuo, representado pelos alambiques de três corpos e o descontínuo, representado pelos alambiques simples.

As principais vantagens do sistema contínuo estão relacionadas à melhor seletividade, produtividade, menor consumo energético, menos defeitos em termos sensoriais e melhor padronização.

Já os sistemas descontínuos e semi-contínuos, têm as vantagens de facilitar a separação da cabeça e cauda e obter um produto rico em aroma, devido às reações que ocorrem com os componentes em contato com as paredes quentes dos alambiques, as quais são favorecidas pela presença de cobre (FARIA et al, 2003; FERREIRA, 2005).

2.2.6 Decreto sobre bebidas alcoólicas

O Decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Para fins de Regulamento, considera-se:

I - bebida: todo produto industrializado, destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica;

II - matéria-prima: toda substância que para ser utilizada como bebida necessita sofrer, em conjunto ou separadamente, tratamento e transformação.

A bebida deverá conter, obrigatoriamente, a matéria-prima natural, vegetal ou animal, responsável por sua característica organoléptica. A bebida que apresentar característica organoléptica própria da matéria-prima natural de sua origem, ou cujo nome ou marca se lhe assemelhe, conterà, obrigatoriamente, esta matéria-prima, nas quantidades mínimas estabelecidas neste Regulamento ou ato administrativo complementar.

A bebida deverá atender aos seguintes requisitos:

- I - normalidade dos caracteres organolépticos próprios da sua natureza;
- II - qualidade e quantidade dos componentes próprios da sua natureza;
- III - ausência de elementos estranhos, de indícios de alterações e de microorganismos patogênicos;
- IV - ausência de substâncias nocivas, observado o disposto neste Regulamento e legislação sobre aditivos.

Bebida alcoólica composta é a bebida alcoólica por mistura, com graduação alcoólica de treze a dezoito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da maceração ou infusão de substâncias vegetais, adicionada de álcool etílico potável de origem agrícola, com adição ou não de açúcares.

Bebida alcoólica de gengibre é a bebida alcoólica composta obtida pela mistura de um macerado alcoólico de gengibre (*Zingiber officinalis*), com álcool etílico potável de origem agrícola, aromatizantes naturais e demais aditivos permitidos em ato administrativo próprio, podendo ser adicionada de açúcares, caso em que será denominada suave ou doce, quando contiver mais de seis gramas por litro, devendo apresentar sabor e aroma das substâncias naturais do rizoma.

2.2.6.1 Dos Destilados Alcoólicos

Os coeficientes de congêneres dos destilados, bebidas destiladas e retificadas, não previstos neste Regulamento, quando necessário, serão estabelecidos em ato administrativo complementar.

Entende-se como coeficiente de congêneres, ou componentes voláteis não-álcool, ou substâncias voláteis não-álcool, ou componentes secundários não-álcool, ou impurezas voláteis não-álcool, a soma de acidez volátil, expressa em ácido acético, aldeídos, expresso em acetaldeído, ésteres, expresso em acetato de etila, álcoois superiores, expressos pelo somatório dos mesmos, e furfural, todos expressos em miligramas por cem mililitros de álcool anidro.

Destilado alcoólico simples de origem agrícola é o produto com graduação alcoólica que vai de 54 a 95° GL, a vinte graus Celsius, destinado à elaboração de

bebidas alcoólicas, e obtido pela destilação simples ou por destilo-retificação parcial seletiva de mosto, ou subprodutos provenientes unicamente de matéria-prima de origem agrícola, de natureza açucarada ou amilácea, resultante da fermentação alcoólica.

A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado apresente aroma e sabor provenientes da matéria-prima utilizada, dos derivados do processo fermentativo e dos formados durante a destilação.

Mosto é a substância de origem vegetal ou animal que contém elemento amiláceo ou açucarado, susceptível de transformar-se principalmente em álcool etílico, por fermentação alcoólica.

Ao mosto fermentável poderão ser adicionadas substâncias destinadas a favorecer o processo de fermentação desde que ausentes no destilado, sendo proibido o emprego de álcool de qualquer natureza.

No destilado alcoólico simples de origem agrícola o teor de furfural não deverá ser superior a cinco miligramas; o álcool metílico não deverá ser superior a duzentos miligramas, com exceção do proveniente de mosto com polpa de frutas fermentadas ou bagaço de uva, cujo limite máximo será setecentos miligramas, sendo todos considerados por cem mililitros do destilado, expressos em álcool anidro.

O destilado alcoólico simples terá a denominação da matéria-prima de sua origem, observada a classificação do artigo seguinte, e não deverá conter aditivo em desacordo com a legislação específica.

O destilado alcoólico simples classifica-se em:

- I - de cana-de-açúcar;
- II - de melação;
- III - de cereal;
- IV - de fruta;
- V - de tubérculo;
- VI - de outros vegetais.

Destilado alcoólico simples de tubérculo é o produto obtido da destilação do mosto fermentado de batata e outros tubérculos, bem como de mandioca ou de beterraba.

2.2.6.2 Das Aguardentes

A aguardente é a bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida do rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples, ou pela destilação do mosto fermentado.

Será denominada de aguardente de cereal ou de vegetal a bebida obtida dessas matérias-primas, podendo ser adoçada e envelhecida, que terá o seu coeficiente de congêneres definido em ato administrativo complementar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Foi utilizado como matéria-prima rizomas frescos de gengibre do tipo caipira, produzidos na região de Tapiraí-SP.

3.2 Caracterização físico-química dos rizomas de gengibre

As análises físico-químicas dos rizomas de gengibre foram realizadas no Laboratório de Análises do Centro de Raízes e Amidos Tropicais CERAT/UNESP. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

3.2.1 Preparo da Amostra

Os rizomas frescos de gengibre foram previamente lavados e triturados em cevadeira industrial. Em seguida procedeu-se a secagem em estufa de circulação de ar em temperatura constante de 50°C por 72 horas. Depois de seco, o gengibre foi moído em moinho e peneirado.

3.2.1.1 Umidade

Determinou-se a umidade por secagem em estufa até a amostra atingir peso constante, a 105°C, segundo o método nº 44-15A da AACC (1983).

3.2.2 Cinzas

A porcentagem de cinzas foi determinada segundo o método nº 81-31 da AACC (1983), através da calcinação das amostras em mufla a 550°C até massa constante.

3.2.3 Proteína

Calculada através de determinação do Nitrogênio pelo método de Micro-Kjedahl usando o fator $f = 6,25$ para conversão, segundo o método AACC 16-10 (1983).

3.2.4 Matéria-graxa

A determinação de matéria graxa foi realizada de acordo com o método nº 30-20 da AACC (1983), onde foi feita extração contínua com hexano num aparelho de Soxhlet.

3.2.5 Açúcares totais

Na determinação dos açúcares totais 0,5g de amostra foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL onde se acrescentou 30 mL de etanol absoluto P.A. e 30 ml de água destilada, levando ao banho com aquecimento entre 60-65°C por 60 minutos. Depois,

acrescentou-se 1mL de HCL P.A. concentrado e agitou-se, retornando ao banho por mais uma hora na mesma temperatura. Após este tempo a amostra foi resfriada e transferida para balão volumétrico de 250mL efetuando-se a neutralização com solução saturada de carbonato de sódio. Em seguida, adicionou-se 1 a 2mL de suspensão de hidróxido de bário a 0,3N e 1 a 2mL de solução de sulfato de zinco a 5%, completando o volume do balão com água destilada. Após agitação foi retirada uma amostra do material e centrifugada, sendo então determinado o teor de açúcares totais (SOMOGY, 1945).

3.2.6 Fibras

Uma amostra de 2 a 5g foi transferida para o tubo de digestão, acrescentando-se 200 mL de solução de H₂SO₄ a 1,25% (p/v), em seguida levado à ebulição branda por 30 minutos. O material foi filtrado em um funil, com papel de filtro já tarado com o auxílio de água destilada. O processo foi repetido, mas utilizando-se de 200 mL de solução de NaOH 1,25% (p/v). Depois da filtragem, o papel de filtro mais amostra foi levado à estufa a 105°C até secagem completa (8 horas), retirado e colocado em dessecador para esfriar por 2 horas, e depois, pesado. Cálculo:

$$\% \text{Fibra alimentar (bruta)} = \frac{\text{peso do papel} + \text{resíduo seco} - \text{peso do papel} \times 100}{\text{massa da amostra}}$$

3.2.7 Amido

A determinação de amido foi realizada pelo método enzimático. A amostra de 200 mg, peneirada, acrescentou-se 42 mL de água destilada e 1 mL de solução comercial de alfa-amilase (Termamyl 120L) a 50% (v/v).

Após estes procedimentos os erlenmeyers foram levados a banho-maria, com agitação suave, a 90°C, durante 15 a 20 minutos, Junto fez-se uma prova em branco. Nas amostras dextrinizadas, foi acrescentado 2,5 mL de solução tampão acetato 4M,

de pH 4,8 e 5 mL de solução recém preparada e filtrada de Amiloglucosidase EC 3.2.1.3 de *Rhizopus* SP (SIGMA), na concentração de 10 mg/mL.

Os erlenmeyers com as amostras mais a prova em branco foram levados ao banho-maria com agitação contínua a 55°C por 120 minutos. Logo após, retirou-se a amostra hidrolisada e esta foi resfriada até a temperatura ambiente transferindo-a para um balão volumétrico de 250 mL. O volume foi completado com água destilada e 5 mL desta diluição foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL que foi completado até acima da metade, com água destilada. A solução foi neutralizada com solução de NaOH a 2N, até pH entre 7 e 9 e o volume foi completado com água destilada. A solução foi filtrada em papel simples e no material filtrado foi dosado o teor de açúcares redutores (SOMOGY, 1945).

Cálculo: %amido= (% A.R.T.) x 0,9

3.2.8 pH

Foram pesadas 10g da amostra fresca de gengibre em um Becker de 250mL, adicionando-se 100mL de água destilada. Levou-se ao agitador magnético durante 30 minutos, sendo em seguida deixado em repouso por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi transferido para um béquer e imediatamente o pH foi determinado ao inserir o eletrodo do pH-metro na amostra.

3.2.9 Acidez Titulável

Após o pH ter sido determinado, manteve-se o pH-metro ligado. Sob agitação magnética, titulou-se com a solução padronizada de NaOH a 0,1N até ser atingido o pH 8,2 a 8,3 no pH-metro, anotando-se o volume gasto.

3.3 Primeiro ensaio

Após a caracterização dos rizomas de gengibre (item 3.2) realizou-se o primeiro ensaio de hidrólise-sacarificação, o qual teve por objetivo comparar a ação de duas α -amilases comerciais fornecidas pela empresa Novo Nordisk: Termamyl 2X e Liquozyme Supra 2X.

Para a realização deste ensaio foi preparada uma suspensão de 6000 gramas contendo gengibre fresco desintegrado em cevadeira de forma que a suspensão ficasse com 10% de amido. Na etapa de liquefação foram utilizados como parâmetros fixos a concentração das α -amilases (1,2 kg de enzima/ tonelada de amido) e o tempo de reação (2 h), sendo que na primeira hora o reator era mantido a 105°C com a adição de 1/3 da quantidade de enzima e, na segunda hora, a temperatura era abaixada para 95° C.

Na sacarificação foi utilizada a enzima amiloglucosidase (AMG 300L) na concentração de 2,25 litros/tonelada de amido, e temperatura de reação de 60°C. Amostras foram retiradas nos tempos 2, 18, 24, 36, 42, 48, 66 e 72 horas para posteriores análises de rendimento do processo e perfil dos açúcares. O processo de hidrólise-sacarificação seguiu as etapas descritas na Figura 6.

As concentrações das enzimas utilizadas foram baseadas em experimentos preliminares realizados por Torres e Leonel (2008), que indicaram a necessidade de uso de maiores concentrações de enzimas devido à alta temperatura de gelatinização do amido de gengibre e a presença de outros componentes como óleos e fibras. Uma vez que a alfa-amilase tem uma temperatura ótima de liquefação muito próxima da gelatinização do amido de gengibre (91,1°C citada por Leonel et al., 2005), exigiu-se uma demanda maior de enzimas para obtenção de maiores rendimentos do processo.

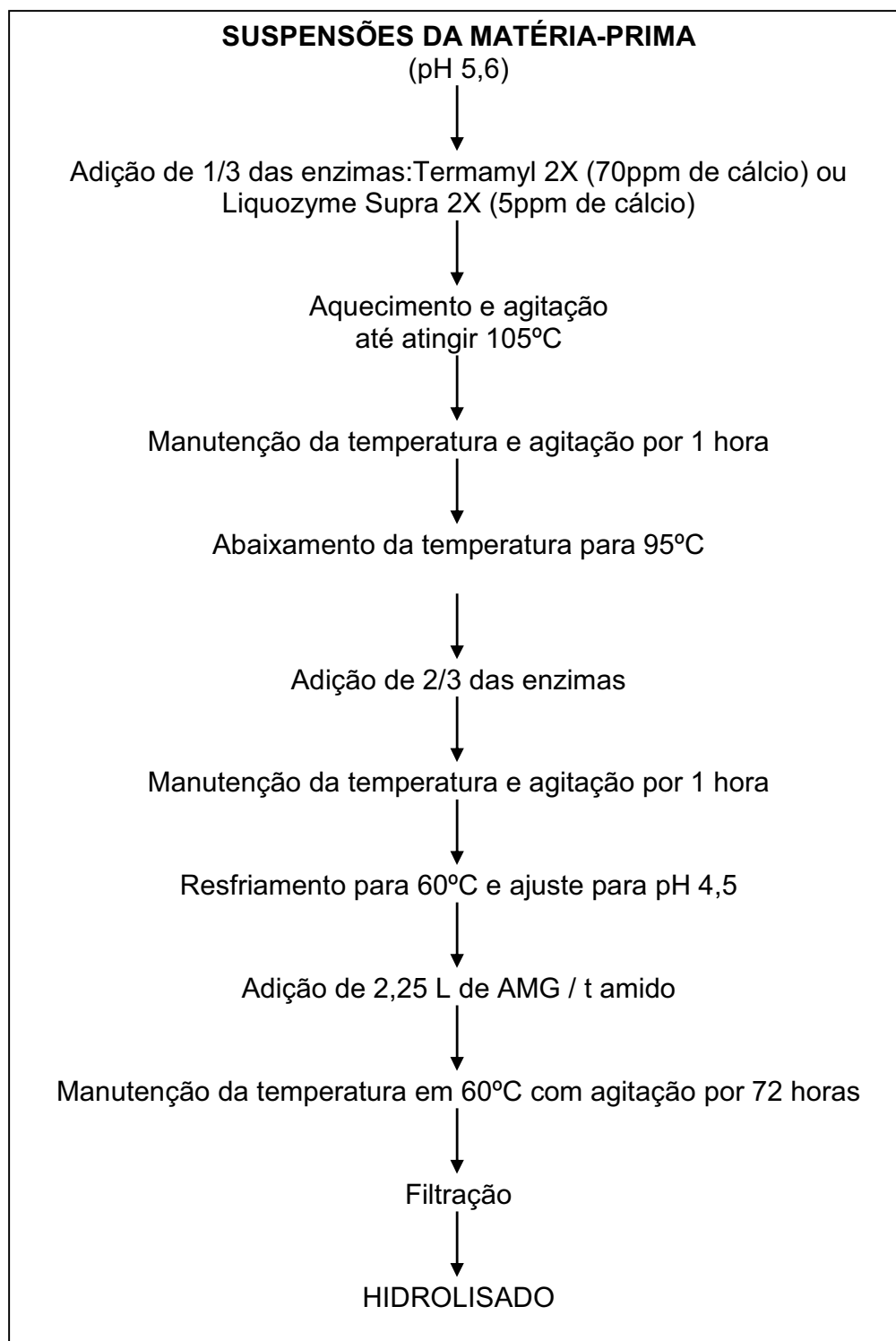


Figura 6 - Processo de hidrólise-sacarificação das suspensões de gengibre.

3.3.1 Análises do hidrolisado

Os hidrolisados obtidos foram caracterizados quanto aos, açúcares totais e perfil dos açúcares.

O teor de açúcares totais foi determinado conforme descrito no item 3.2.5.

O perfil dos açúcares foi realizado em cromatógrafo líquido, marca Varian modelo Pró-Star com duas bombas binárias e índice de refração (detector) com amostrador automático, sendo a coluna de marca BIORAD modelo AMINEX HPX 87P (fase estacionária Pb) 300 x 0,25mm, utilizando como fase móvel água e fluxo da amostra de 0,6 ml/minuto, na temperatura de 80°C, que permite a quantificação de sacarídeos de Dp de 1 a 9 (KANEKO et al., 1990).

Os perfis em área foram convertidos em concentração (g/L) a partir dos padrões. As soluções padrões foram feitas a partir de soluções PA dos açúcares: glicose, frutose, maltose e sacarose em concentração de 10 g /L.

3.3.2 Cálculo do Rendimento de Processo

O rendimento do processo foi calculado através da fórmula:

$$\text{Rendimento \%} = \text{Teórico/Prático} \times 100$$

3.3.3 Análise dos dados

Para analisar o efeito da ação das α -amilases e do tempo de ação da amiloglucosidase sobre a concentração e perfil de açúcares foi feita a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparação de médias de Tukey, no nível de 5% de probabilidade.

3.4 Segundo ensaio

A partir dos resultados obtidos no primeiro ensaio, foi realizado o segundo ensaio que teve por objetivo avaliar o efeito das concentrações das enzimas Termamyl 2X e AMG 300L, sobre o teor de glicose, dextrina e rendimento do processo.

3.4.1 Delineamento experimental

Para a realização deste ensaio foi utilizado o delineamento ‘central composto rotacional’ para dois fatores, segundo Barros Neto; Scarmínio, Bruns (2007), com um total de 9 tratamentos.

Os parâmetros do processo, estabelecidos como variáveis independentes, foram estudados em 3 níveis codificados como -1, 0, +1, calculados de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = X_i - Z / \Delta X_i$$

onde:

x_i = valor codificado da variável X_i ;

X_i = valor real da variável;

Z = valor real da variável no ponto central;

ΔX_i = valor do intervalo de variação de X_i ;

Este delineamento apresenta também dois níveis de variáveis axiais que são codificadas como $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor depende do número fatorial ($F = 2^K$) do delineamento e do número de variáveis independentes ($K = 2$), sendo o valor definido pela equação:

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^K)^{1/4} = 1,4142$$

Os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos dentro das possibilidades operacionais do processo de hidrólise, baseados também em dados de literatura e ensaios preliminares (Tabela 2).

Os parâmetros fixos do processo foram: as temperaturas e tempo de ação do reator na etapa de liquefação (105°C/1h e 95°C/1h), a temperatura da Incubadora Refrigerada na sacarificação (60°C), a agitação desta (110 rpm) e o tempo de reação 24 horas.

Tabela 2 - Parâmetros variáveis do processo de hidrólise-sacarificação

Níveis		Fatores ou variáveis independentes	
Axiais	Codificados	Termamyl 2X (Kg/t amido)	AMG 300L (L/t amido)
- α	-1,41	0,50	0,97
	-1	0,80	1,50
	0	1,20	2,25
	+1	1,60	3,00
+ α	+1,41	1,88	3,53

3.4.2 Processo de hidrólise-sacarificação.

Foram preparadas suspensões de gengibre desintegrado e água na concentração de 10% de amido. As suspensões foram submetidas ao processo de hidrólise em reator de temperatura controlada com capacidade para 18 litros e agitação constante (Figura 7).

Na liquefação, a suspensão foi mantida por uma hora em temperatura de 105°C com um terço da dose de enzima Termamyl 2X estipulada para cada tratamento, e, por mais uma hora com o restante da enzima na temperatura de 95°C.

Na etapa de sacarificação foi realizada a correção do pH para 4,5-4,8 com ácido sulfúrico 3M, e a adição da amiloglicosidase (AMG 300L), reagindo por vinte e

quatro horas a 60°C, em Incubadora Refrigerada com Agitação da marca TECNAL modelo TE-422 (110 rpm).

3.4.3 Análises dos hidrolisados

Após o processo de hidrólise, amostras foram retiradas, centrifugadas em Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R da marca FANEM, a 4000rpm durante 15 minutos e as análises procederam-se no sobrenadante.

Foi realizada análise da concentração de glicose pelo método Glicoseoxidase, onde 1 mL da amostra foi diluído em balão de 100 mL. Dessa diluição retirou-se uma alíquota de 20 microlitros e adicionou-se 2 mL de reativo de cor. Após esse processo as amostras foram encaminhadas para banho de imersão à 37°C por 10 minutos e posteriormente agitadas. Realizou-se então a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nanômetros.

As análises da concentração de dextrinas e perfil dos açúcares do hidrolisado foram feitas em cromatógrafo líquido (CLAE), conforme descrito no item 3.3.1. O rendimento de processo foi calculado dividindo-se o valor obtido (prático) nas análises pelo valor teórico obtido através das reações de obtenção de glicose a partir do amido, considerando o volume de hidrolisado adquirido em cada tratamento.



Figura 7 – Reator utilizado no processo de hidrólise da suspensão de gengibre.

3.4.4 Análise dos dados

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

Para análise dos resultados experimentais, a metodologia descreve o comportamento de um sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes (X_k) e a variável dependente ou resposta (Y_i). A resposta é função dos níveis nos quais estes fatores foram combinados e definidos conforme BOX & DRAPER (1987):

$$Y_i = F(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

Através de uma análise de regressão, pode ser ajustado para cada resposta (Y) um polinômio de segunda ordem com as variáveis explicativas (X_k). A expressão geral utilizada para prever o comportamento de cada resposta avaliada pode ser escrita da seguinte forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

onde,

Y_i = função resposta;

X_1, X_2 = valores das variáveis independentes;

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

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

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

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

ε = erro experimental.

A Tabela 3 mostra o delineamento experimental com os níveis codificados e reais das variáveis independentes, nos diferentes tratamentos.

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

Tabela 3 - Delineamento experimental do segundo ensaio.

Ensaio	Codificado		Real	
	X1	X2	Termamyl 2X (Kg/t de amido)	AMG 300L (L/t amido)
1	-1	-1	0,80	1,50
2	-1	1	0,80	3,00
3	1	-1	1,60	1,50
4	1	1	1,60	3,00
5	0	0	1,20	2,25
6	0	0	1,20	2,25
7	0	0	1,20	2,25
8	$-\alpha$	0	0,50	2,25
9	$+\alpha$	0	1,88	2,25
10	0	$-\alpha$	1,20	0,97
11	0	$+\alpha$	1,20	3,53

$\pm |\alpha| = 1,4142$; X1, X2 = variáveis dependentes: concentração de alfa-amilase Termamyl 2X e concentração de amiloglucosidase AMG 300L, respectivamente.

3.5 Terceiro ensaio

Este ensaio teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura, tempo e concentração de levedura, sobre o teor de etanol, açúcares residuais, metanol, glicerol e acetona.

3.5.1 Preparo do mosto

O volume de 4 litros de hidrolisado, obtido conforme as condições descritas na Figura 6 nas concentrações de 1,6 Kg Termamyl 2X/ t amido e 3,0 L de AMG 300L/t amido, foi dividido em 20 porções de 200 mL e adicionadas de fermento comercial (*Saccharomyces cerevisiae* cepa Y-904, desidratada, fornecida pelo fabricante Mauri Brasil), nas concentrações (p/p) estabelecidas no delineamento experimental descrito na Tabela 4.

3.5.2 Delineamento experimental

O processo de fermentação seguiu o delineamento central composto rotacional para três fatores, sejam eles: temperatura de fermentação (°C), concentração de fermento (%) e tempo de fermentação (h).

Este delineamento apresenta dois níveis de variáveis axiais que são codificados como $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor depende do número fatorial ($F = 2^K$) do delineamento e do número de variáveis independentes ($K = 3$), sendo o valor definido pela equação:

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^K)^{1/4} = 1,681$$

Para análise dos resultados experimentais, foi seguido o mesmo sistema do segundo ensaio no qual estão combinadas as variáveis independentes (X_k) e a variável dependente ou resposta (Y_i).

O parâmetro fixo definido em ensaios preliminares foi a agitação da Incubadora Refrigerada em 110 rpm.

Os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos com base em resultados preliminares (Tabela 4).

Tabela 4 -Variáveis de trabalho com seus respectivos níveis do terceiro ensaio.

Codificado	Variáveis Real	Níveis				
		- α	-1	0	1	+ α
X1	Tempo de fermentação (horas)	17	20	24	30	33
X2	Temperatura da fermentação (°C)	23	26	30	34	37
X3	Concentração de levedura (% p/p)	0,22	0,75	1,50	2,25	3,0

$\pm |\alpha| = 1,681$

3.5.3 Análises dos vinhos

Após o processo de fermentação as amostras foram centrifugadas para separação do vinho fermentado e da levedura. As análises procederam-se no sobrenadante com o objetivo de determinar os perfis de composição de substâncias presentes no vinho como etanol, glicerol, metanol açúcares residuais, além das concentrações dos mesmos.

3.5.3.1 Contagem de células

A determinação da viabilidade e número de células totais antes e após a fermentação foi feita segundo a metodologia de Lee et al. (1981). Em um tubo de ensaio foram colocados 0,5 mL da suspensão de levedura (mosto em fermentação) e 9,5 mL de solução corante. O tubo foi fechado e agitado intensamente por 30 segundos e depois deixado no suporte por 1 minuto. A leitura foi feita em microscópio ótico através de contagem em câmara de Neubauer de duas montagens diferentes, sendo contados cinco quadrantes. Foram contadas apenas as células, sendo consideradas as coradas de azul como mortas e as não coradas como vivas. Não foram considerados os brotos, flocos de células e pseudomicélio.

Os cálculos para a determinação da viabilidade e número total de células foram:

Número total de células / ml = $N \times 2,5 \times 10^5 \times D$ onde,

N= número total de células presentes no quadrado médio

D= fator de diluição

% de células viáveis = $\frac{\text{número células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100$

A solução corante tem a seguinte composição: azul de metileno (0,025 %), NaCl (0,9 %), KCl (0,042 %), $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,048 %), NaHCO_3 (0,02 %), glicose (1,0%). A solução será mantida em agitação por 6 horas e filtrada em papel de filtro.

3.5.3.2 Açúcares residuais, etanol, metanol e glicerol.

As análises dos açúcares residuais, etanol, metanol e glicerol foram realizadas em cromatógrafo líquido. A coluna utilizada para detecção dos compostos foi a AMINEX HPX 87H (fase estacionária H⁺) 300 x 0,25mm, sendo utilizado como fase móvel ácido sulfúrico 0,001N, fluxo da amostra 0,6 ml/minuto e temperatura de 50°C.

Os perfis em área dos componentes dos vinhos foram convertidos para concentração (g/L) a partir de soluções padrões.

3.5.3.3 Perfil cromatográfico dos componentes voláteis no destilado

Amostras de 25 mL dos vinhos obtidos nos diferentes ensaios de fermentação foram colocadas em balão de fundo chato acoplado à coluna de Vigraux e aquecidos para a destilação das amostras.

As amostras destiladas foram analisadas em cromatógrafo de fase gasosa (CG) modelo 3380 da Varian, equipado com detector tipo FID e com coluna marca ohi valley 60mX0,25mm SD, modelo OV 1301 bonded 1,4micras.

As condições de operação para a determinação das porcentagens de etanol, metanol e acetona foram: rampa de temperatura 35°C durante 5 minutos e de 35 a

100°C a 1º minuto, gás de arraste nitrogênio, fluxo 40mL. min⁻¹, e volume injetado de 1 microlitro, tempo total de corrida 135 minutos.

3.5.4 Análise dos dados

O experimento de fermentação foi conduzido num delineamento fatorial 3³ incompleto, com três fatores ou variáveis independentes, e três níveis codificados.

Para a análise estatística dos resultados experimentais foi utilizado o modelo:

$$y_k = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_{ik} + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} x_{ik} x_{jk} + e_k, \text{ onde:}$$

y_k = valor observado da variável dependente no nível K , $K = 1, \dots, 20$;

x_{iK} = i -ésima variável independente, no nível K , $i = 1, 2, 3$;

b_0 = parâmetro do modelo, independente de x ;

b_i = parâmetros correspondentes aos efeitos lineares de x_i ;

b_{ij} = parâmetros correspondentes aos efeitos de 2ª ordem de $x_i x_j$, $i = 1, 2, 3, j = 1, \dots, 3$;

e_k = erro experimental associado à k -ésima parcela.

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do sistema SAS. A significância do modelo foi testada pela análise de variância (ANOVA), sendo adotado o nível de significância alfa de 5%.

Inicialmente foi realizada a análise de variância sendo determinados os coeficientes de regressão do modelo incluindo todos os parâmetros (linear, quadrático e interação). O ajuste do modelo foi feito pela opção “step-wise”, sendo que o modelo ajustado obtido foi validado pelo teste F utilizando-se como denominador o quadrado médio do erro puro (BARROS NETO et al., 2003).

Na construção das superfícies de resposta duas variáveis independentes variaram dentro das regiões estudadas e a terceira foi mantida fixa no ponto central (Tabela 5).

Tabela 5 - Delineamento experimental do terceiro ensaio.

Ensaio	Codificado			Real		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1	20	26	0,75
2	-1	-1	1	20	26	2,25
3	-1	1	-1	20	34	0,75
4	-1	1	1	20	34	2,25
5	1	-1	-1	30	26	0,75
6	1	-1	1	30	26	2,25
7	1	1	-1	30	34	0,75
8	1	1	1	30	34	2,25
9	$-\alpha$	0	0	17	30	1,50
10	$+\alpha$	0	0	33	30	1,50
11	0	$-\alpha$	0	24	23	1,50
12	0	$+\alpha$	0	24	37	1,50
13	0	0	$-\alpha$	24	30	0,22
14	0	0	$+\alpha$	24	30	3,00
15	0	0	0	24	30	1,50
16	0	0	0	24	30	1,50
17	0	0	0	24	30	1,50
18	0	0	0	24	30	1,50
19	0	0	0	24	30	1,50
20	0	0	0	24	30	1,50

$\pm |\alpha| = 1,681$; X1, X2, X3 = variáveis dependentes: tempo de fermentação, temperatura do processo e concentração de levedura, respectivamente; X1 = Tempo (horas); X2 = Temperatura (°C); X3 = Concentração de levedura (% p/p) A partir da equação de regressão obtida por esta técnica, foi possível obter gráficos com o auxílio do software “Statistica”.

3.6 Quarto ensaio

Este ensaio teve por objetivo a validação experimental das condições estabelecidas pelas análises estatísticas dos experimentos anteriores, bem como, a destilação do vinho obtido para a obtenção da aguardente de gengibre e sua caracterização. O ensaio foi realizado em batelada sem repetições.

3.6.1 Preparo do hidrolisado

Uma suspensão de 16 kg contendo massa ralada de gengibre e água (10% de amido) foi colocada no reator (Figura 7) e realizou-se o processo de hidrólise utilizando 1,6 Kg de Termamyl 2X/ t de amido e 3,0 L de AMG 300L/ t amido seguindo as etapas descritas na Figura 6.

Após o processo de hidrólise a suspensão foi filtrada em filtro a vácuo marca MF DIMAN –ME (Figura 8), onde o líquido (hidrolisado de gengibre) foi separado da parte sólida (resíduo fibroso) e submetido a análise em cromatografia líquida de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.3.



Figura 8 – Filtro a vácuo utilizado para separar o extrato líquido das fibras após o processo de hidrólise dos rizomas de gengibre.

3.6.2 Fermentação

Considerando os resultados obtidos no terceiro ensaio, 9 kg do hidrolisado de gengibre, obtidos após filtração da suspensão submetida à hidrólise, foram colocados em dois erlenmeyers de 6 litros sendo adicionados 1,5% levedura. Os erlenmeyers foram mantidos em agitação (100rpm) em incubadora refrigerada a 26°C por 20h.

O vinho foi caracterizado quanto ao teor de etanol, metanol, glicerol e açúcares residuais em cromatográfico líquido. A coluna utilizada para detecção dos compostos foi a AMINEX HPX 87H (fase estacionária H+) 300 x 0,25mm, sendo utilizado como fase móvel ácido sulfúrico 0,001N, fluxo da amostra 0,6 ml/minuto e temperatura de 50°C.

Os perfis em área dos componentes do vinho foram convertidos para concentração (g/L) a partir de soluções padrões.

3.6.3 Destilação

A destilação do vinho de gengibre foi realizada em alambique de cobre com capacidade de 20 litros (Figura 9). O processo de destilação teve a duração de 3h, sendo realizadas coletas a cada 100 mL de destilado para a separação das frações: cabeça, coração e cauda.



Figura 9 – Alambique de cobre utilizado na destilação do vinho fermentado de gengibre.

3.6.4 Caracterização das frações destiladas e da vinhaça

Após a separação das amostras destiladas e da vinhaça estas foram caracterizadas quanto ao teor alcoólico, acidez titulável e perfil cromatográfico.

- Teor alcoólico:

O percentual de etanol das amostras foi determinado utilizando-se alcoômetro de Gay-Lussac (Instituto Adolfo Lutz, 2007).

- Determinação da acidez volátil e total:

A acidez volátil e total das amostras foi determinada de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2007).

- Preparação de derivados carboxílicos das 2,4-DNPH

O destilado obtido foi caracterizado quanto a sua composição química de aldeídos, segundo metodologia por derivatização proposta por Nascimento et AL (1997).

Os derivados carboxílicos de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) foram obtidos conforme descrito por Nascimento (1997), dissolveu-se 0,40g de 2,4-DNPH em ácido sulfúrico concentrado P.A. (2 ml) e água destilada (3 ml). Nesta solução adicionou-se: 0,10g de aldeídos padrões (acetaldeído, hidroximetilfurfural, formaldeído, butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído), dissolvidos em etanol (15 ml), num total de 6 soluções. Os componentes derivados foram isolados via filtração e purificados por recristalização com etanol absoluto.

- Procedimento analítico para aldeídos

Uma solução 0,4% de 2,4-dinitrofenilidrazina foi preparada dissolvendo-se 0,40g em 100 ml de acetonitrila. Em frasco adicionou-se consecutivamente: 1 ml da solução de 2,4-dinitrofenilidrazina (0,4%), 4 ml da amostra de etanol destilado e 20 microlitros de H_3PO_4 . A solução restante foi agitada e mantida em repouso, por pelo menos 45 minutos, em temperatura de 25°C. Em seguida, submeteu-se 25 microlitros da amostra às análises cromatográficas em equipamento descrito no item 3.3.1 utilizando coluna de sílica Hypersil BDS – C18 125X 4 nm, em temperatura de 25°C, fase móvel gradiente metanol/água v/v 65/35% por 6 minutos, 85/15% por 4 minutos, 80/20% por 10 minutos, 75/35% por 5 minutos, detector UV 365 nm, vazão de 0,3 ml/min.

A identificação e quantificação das substâncias foram realizadas por comparação com cromatogramas de substâncias padrão, injetadas nas mesmas condições.

- Procedimento analítico para ácidos ésteres e alcoóis

Para a verificação das concentrações dos compostos secundários: álcool isoamílico, n-butanol, tec-butanol, álcool butírico, isopropanol, acetato de etila, metil éster, acetonitrila, foram realizadas em Cromatógrafo da marca Varian, modelo 3380, detectos tipo FID e com coluna marca Ohi Valley 60mtx0,25nm, modelo OV 1301

bonded 1,4 micras. Rampa de temperatura 35°C durante 5 minutos e de 35 a 100°C a 1° minuto, tempo total de corrida 135 minutos.

- Alcoóis superiores e compostos secundários

Os teores de alcoóis superiores foram obtidos pela soma dos componentes n-propílico, isobutílico e isoamílico e os compostos secundários pela somatória da acidez volátil, acetaldeído, acetato de etila e alcoóis superiores (BRASIL, 2005).

- Teor de cobre

A determinação do teor de cobre foi realizada utilizando-se o Sistema de Análise por Injeção Seqüencial (SAI) com detecção em espectrofotômetro de chama.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeiro ensaio

O gengibre utilizado neste ensaio foi caracterizado quanto a sua composição e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição centesimal média dos rizomas de gengibre tipo caipira adquiridos em Tapiraí – SP.

Constituintes (g/100g rizomas frescos)	Média
Umidade	83,09
Cinzas	1,09
Proteínas	1,74
Fibras	1,47
Matéria graxa	0,33
Açúcar solúvel	0,8
Amido	11,4
pH	7,2
Acidez (mL NaOH 1N)	4,3

Os resultados obtidos concordam com Leonel (2005), onde foram encontrados valores de: umidade 84%, proteína 1,2%, matéria graxa 0,86%, fibra 0,93%, cinzas 0,96%, açúcar total 0,34% e amido 11,42% na matéria úmida sendo o teor de amido da matéria seca em torno de 65%. Os rizomas de gengibre apresentam considerável teor de amido o que torna esta matéria prima interessante para o processo de hidrólise-sacarificação para obtenção de açúcares fermentescíveis.

4.1.1 Caracterização dos hidrolisados

Os resultados obtidos no primeiro ensaio no qual se avaliou o efeito da combinação das enzimas Termamyl 2X (T1) ou Liquozyme Supra 2X (T2) com a AMG 300L, esta em diferentes tempos de ação, sobre o teor de glicose do hidrolisado estão apresentados na Tabela 7 e Figura 10.

Tabela 7 - Médias e análise de variância para a comparação do teor de glicose em g/l nos hidrolisados obtidos a partir da ação das duas α -amilases em duas horas de liquefação.

α -amilases	Glicose (g/l)*				
Termamyl	8,29a				
Liquozyme	2,02b				

ANOVA					
	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	PROB. >F
Enzimas	1	58,97	58,87	1395,59	0,00024
Resíduo	4	0,17	0,04		
Total	5	59,14			

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Como pode ser observado após duas horas de ação ocorreu diferença significativa para o teor de glicose no hidrolisado, sendo este superior no tratamento que utilizou a Termamyl 2X.

O teor de glicose no hidrolisado após a ação de amilases é determinado pela dosagem da enzima, condições de processo e eficiência da enzima. Segundo o fabricante das enzimas, a Liquozyme Supra (0,4Kg/t matéria seca, 5 ppm Ca, pH 5,5)

apresenta uma maior eficiência na porcentagem de dextrose equivalente (11%) quando comparada com a Termamyl 120L (0,4Kg/t matéria seca, 70ppm Ca, pH 6,2) após duas horas de ação (9%), contudo, não é mostrada a comparação com a Termamyl 2X (NOVOZYMES, 2008).

Após a ação das α -amilases avaliou-se o efeito do tempo de ação da amiloglucosidase (AMG 300L) sob o teor de glicose nos hidrolisados liquefeitos pelas duas enzimas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

A análise estatística dos dados mostrou terem ocorrido diferenças significativas entre os hidrolisados liquefeitos pelas duas α -amilases em todos os tempos de ação da AMG 300L, com os maiores teores para os hidrolisados que tiveram a ação da Liquozyme Supra 2X.

Já com relação ao efeito do tempo de ação da AMG 300L dentro de cada tratamento das α -amilases, foi observado que no tratamento com Termamyl 2X o teor de glicose aumentou significativamente das 18h para as 24h de ação da amiloglucosidase, não ocorrendo diferença significativa após este período. Já no tratamento com Liquozyme Supra 2X, os maiores teores de glicose foram obtidos após 48h de ação da AMG 300L, com o maior teor obtido após 72h de ação da enzima.

Tabela 8 - Médias e análise de variância para a comparação do teor de glicose nos hidrolisados obtidos após a liquefação pelas duas α -amilases, nos diferentes tempos de ação da AMG 300L.

Tempo (h)	Termamyl*	Liquozyme
18**	85,54Bb	106,37Ac
24	92,31Ba	106,37Ac
42	92,51Ba	107,28Abc
48	93,41Ba	109,11Aabc
66	94,53Ba	110,52Aab
72	95,08Ba	111,13Aa

ANOVA

	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	PROB. >F
Enzima	1	2371,69	2371,69	1209,74	0,00001
Tempo	5	202,15	40,43	20,6226	0,00001
Resíduo	29	56,85	1,96		
Total	35	2630,70			

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

**Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos para o perfil de açúcares no hidrolisado após a ação das α -amilases, ilustrando as porcentagens de glicose e outros açúcares como maltose, maltotriose, maltotetraose, sacarose e dextrinas nos hidrolisados.

Os resultados do perfil dos açúcares na etapa de liquefação do amido para as α -amilases testadas demonstraram maiores porcentagens de dextrinas e glicose no hidrolisado liquefeito pela Liquozyme Supra 2X, com menores porcentagens de sacarose, maltotriose e maltose quando comparado com o hidrolisado obtido após a ação da Termamyl 2X.

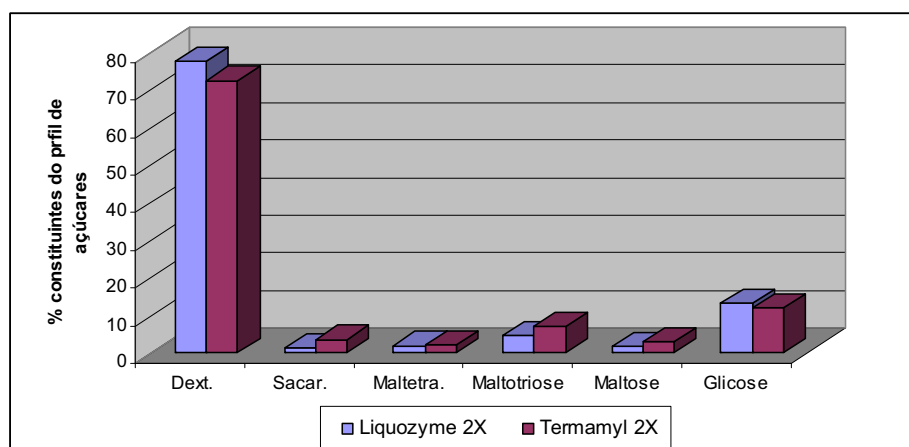


Figura 10 – Perfil dos açúcares nos hidrolisados após ação das α -amilases.

A Figura 11 mostra os resultados obtidos no perfil de açúcares dos hidrolisados nos diferentes tempos de ação da amiloglucosidase. Foi possível observar elevadas porcentagens de glicose (>98%) nos hidrolisados independente da α -amilase utilizada na etapa de liquefação, sendo que no tratamento com a Termamyl 2X o tempo de 24h de ação da AMG é mais adequado.

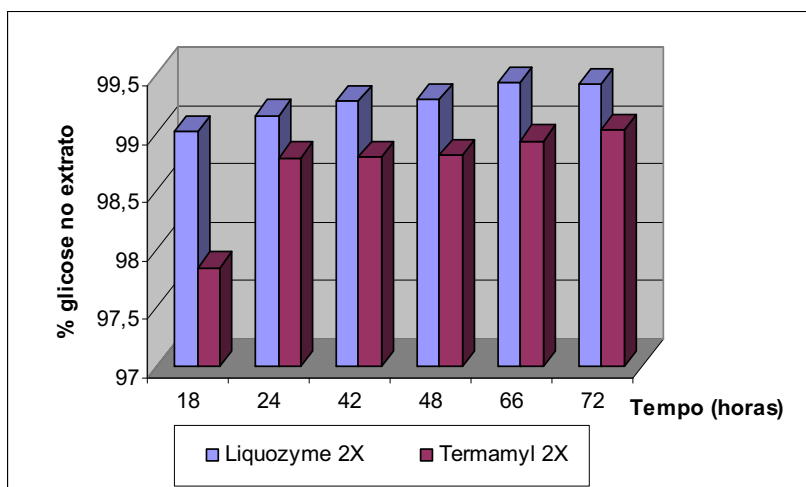


Figura 11- Efeito do tempo de ação da AMG 300L no teor de glicose após a ação das duas α -amilases.

Tavares (2004), avaliando diferentes xaropes para obtenção de etanol, produzidos a partir de amido farelo de mandioca e cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* L36-w4, verificou que o ensaio realizado com meio preparado a partir de um xarope de farinha de mandioca que sofreu dextrinização por 1h, apresentou um rendimento similar ao obtido no ensaio padrão, e uma maior produtividade em etanol, cerca de 27% mais elevada que o ensaio padrão. Isso indica que, provavelmente, a dextrinização realizada, gerou moléculas menores de oligossacarídeos e isso fez com que a ação da glucoamilase fosse facilitada.

Considerando o maior rendimento em glicose, conforme demonstrado na figura 12, a menor porcentagem de dextrina na liquefação realizada pela Termamyl 2X e, também, o fato desta enzima ser fabricada no Brasil, possibilitando menores custos de processo de hidrólise, além de diminuir os riscos de escassez do produto e problemas derivados de fretamento e condições de transporte. A Termamyl 2X foi selecionada para dar continuidade nos outros ensaios.

4.1.2 Rendimento do processo

Através da análise dos resultados obtidos na caracterização dos resíduos finais, bem como dos hidrolisados, estabeleceu-se o balanço de massa dos diferentes tratamentos (Figura 12). Foi observado que no Tratamento 1, no qual o processo iniciou com 970,63g de matéria seca dos quais 654,36g era amido; 86,85 % do amido e 67,65 % da matéria seca foram hidrolisados. No Tratamento 2 foi observado que 89,71% do amido foram hidrolisados. Quanto aos açúcares retidos no resíduo observou-se que 19,7% do total obtido ficaram presos ao resíduo no T1 e 22,89 % no T2.

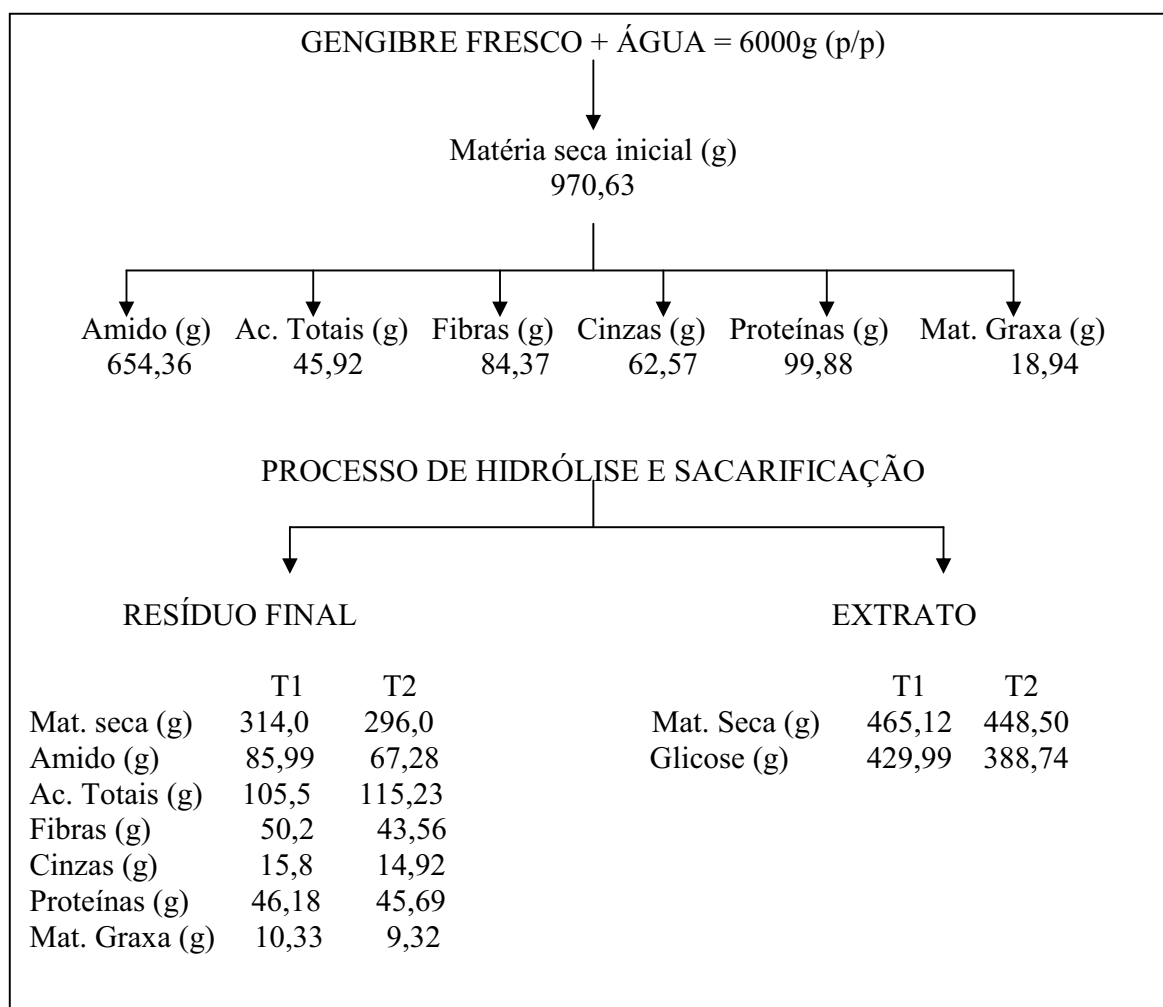


Figura 12 - Balanço de massa do processo de hidrólise-sacarificação do rizoma de gengibre nos diferentes tratamentos.

Analisando-se os resultados obtidos neste experimento pode-se verificar uma pequena diferença de rendimento na utilização das duas enzimas no processo de hidrólise de gengibre. Porém o Tratamento 2 mostrou-se mais eficiente no percentual de amido hidrolisado, o que corrobora para a decisão de utilização da Termamyl 2X como a enzima para ser utilizada na etapa de liquefação.

Em estudo da ação de enzimas complementares (celulase e pectinase) na hidrólise de farelo de mandioca realizado por Leonel & Cereda (1999), Os resultados obtidos demonstraram que 63,42% do amido foram hidrolisados no tratamento em que não se utilizaram enzimas complementares. No tratamento com as duas enzimas complementares foram hidrolisados 89,55%, no tratamento com celulase 65,42% e no tratamento com pectinase 88,73%. Isto demonstra o aumento do rendimento de processo devido à complementação do uso de enzimas convencionais (alfa-amilase e amiloglicosidase) com outras não-convencionais ao processo de sacarificação do amido.

4.2 Segundo ensaio

A concentração de enzimas é fator fundamental na hidrólise de derivados amiláceos e interfere substancialmente no processo. Encontrar a concentração ideal para o processo caracteriza uma hidrólise eficiente, além de aumentar o rendimento em açúcares fermentescíveis proporcionando também resíduo final com menor teor de amido residual.

Os resultados obtidos no segundo ensaio, onde foi comparado o efeito da concentração da enzima Termamyl 2X e da enzima amiloglicosidade AMG 300L, sobre o teor de glicose (g/l), teor de dextrina (g/l) e rendimento do processo (%), estão apresentados na Tabela 9.

4.2.1 Glicose

No processo completo de hidrólise, o amido é convertido em uma mistura de vários oligossacarídeos e dextrinas diferentes pelo uso da α -amilase. Essas

maltodextrinas, ligeiramente doces, são submetidas a mais uma conversão pela adição de outras enzimas promotoras do desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina que ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose (ENZIMAS, 2007).

Através da Tabela 9 é possível observar que os resultados dos tratamentos apresentaram teores de glicose entre 79,866 g/L e 109,06 g/L como valores mínimos e máximos respectivamente.

Tabela 9 - Resultado dos valores de glicose (g/L) e dextrina (g/L) encontrados no hidrolisado de gengibre em cada tratamento e rendimento do processo (%).

Tratamento	Var. codificadas		Var. independentes		Variáveis dependentes		
	X1	X2	Termamyl	AMG	Glicose	Dextrina	Rend.
1	-1	-1	0,80	1,50	84,564	1,432	58,67
2	-1	1	0,80	3,00	87,584	0,395	60,75
3	1	-1	1,60	1,50	95,973	0,916	66,57
4	1	1	1,60	3,00	102,013	0,271	70,73
5	0	0	1,20	2,25	81,544	0,332	56,52
6	0	0	1,20	2,25	81,208	0,295	56,32
7	0	0	1,20	2,25	81,544	0,294	56,52
8	-1,41	0	0,50	2,25	79,866	0,337	55,41
9	1,41	0	1,88	2,25	109,060	0,372	75,66
10	0	-1,41	1,20	0,97	93,289	0,749	64,7
11	0	1,41	1,20	3,53	105,033	0,179	72,82

X1= Concentração de Termamyl 2X (g/Kg amido); X2= Concentração de AMG 300L (mL/Kg amido)

A análise de regressão mostrou ter ocorrido efeito significativo ($p < 0,05$) dos fatores concentração de Termamyl e de AMG sobre este parâmetro. Contudo, não foi observado efeito significativo da interação dos fatores (Tabelas 10 e Apêndice 1). O modelo ajustado deu origem à equação 1 que determina a concentração de glicose, sendo:

$$\text{Glicose} = 81,45 + 8,4T + 3,21\text{AMG} + 5,45T^2 + 7,82\text{AMG}^2 \text{ (Equação 1)}$$

O gráfico de superfície de resposta (Figura 13) mostra que concentrações maiores de alfa-amilase e de amiloglicosidase estabelecem maiores teores de glicose no hidrolisado.

Tabela 10 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose (g L^{-1}) nos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	81,45			
Termamyl (L)	8,40	1,27	1	0,0006
AMG (L)	3,21	1,27	1	0,0453
Termamyl (Q)	5,45	1,52	1	0,0116
AMG (Q)	7,81	1,52	1	0,0021
R^2	0,9310			

ANOVA

	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	4	1048,33	262,08	20,23	0,0012
Resíduos	6	77,74	12,96		
Total	10	1126,07			

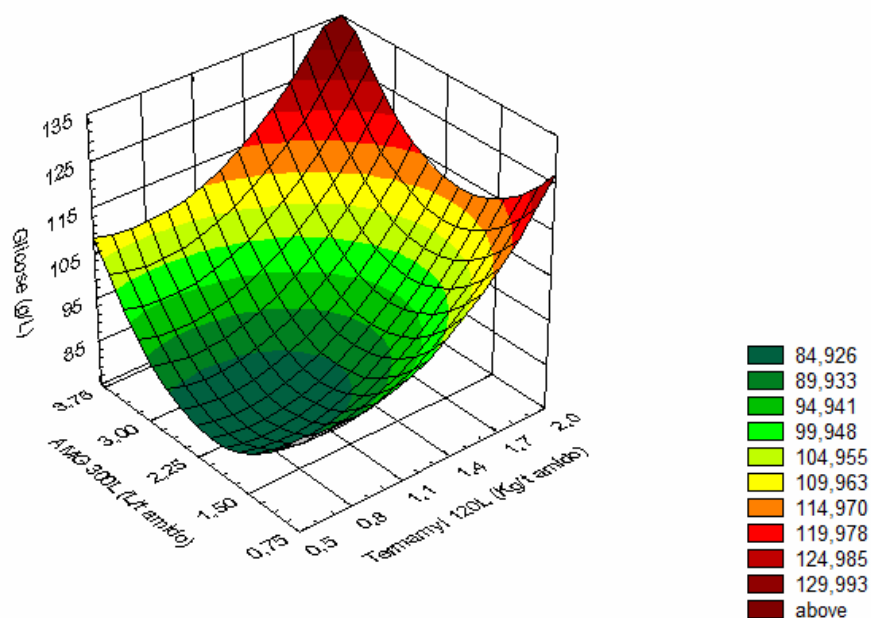


Figura 13 – Efeito das concentrações de Termamyl 2X e AMG 300L sobre o teor de glicose nos hidrolisados de gengibre.

4.2.2 Dextrina

A formação de dextrinas se dá a partir da quebra das ligações α -1,4 da molécula de amido, aleatoriamente, pelas enzimas denominadas alfa-amilases. Quanto maior a quantidade de dextrinas formadas no meio, mais o processo se mostrou eficiente. O meio de reação demonstra-se menos viscoso devido o rompimento dessas estruturas que compõem o amido.

Para o fator dextrina, os valores variaram de 0,179 g/l a 1,432 g/l, sendo estes mínimos e máximos respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 9. Através da análise de regressão pôde-se observar efeito significativo ($p < 0,05$) do fator concentração de AMG sobre este parâmetro. Contudo, não foi observado efeito significativo da concentração de Termamyl e também da interação dos fatores para este parâmetro (Tabelas 11 e Apêndice 2). O modelo ajustado deu origem à equação 2 que determina a concentração de dextrina, sendo:

$$\text{Dextrina} = 0,5065 - 0,3116\text{AMG (Equação 2)}$$

Tabela 11 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	0,5065			
AMG (L)	-0,3116	0,0952	1	0,0096
R ²	0,5435			

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	1	0,7746	0,7746	10,71	0,0096
Resíduos	9	0,6507	0,0723		
Total	10	1,4253			

Através da Figura 14, pôde ser observado que há diminuição da permanência de dextrina no extrato a medida que se adiciona enzima AMG 300L. Quanto maior a concentração de amiloglucosidase, menor a concentração de dextrina encontrada no extrato hidrolisado.

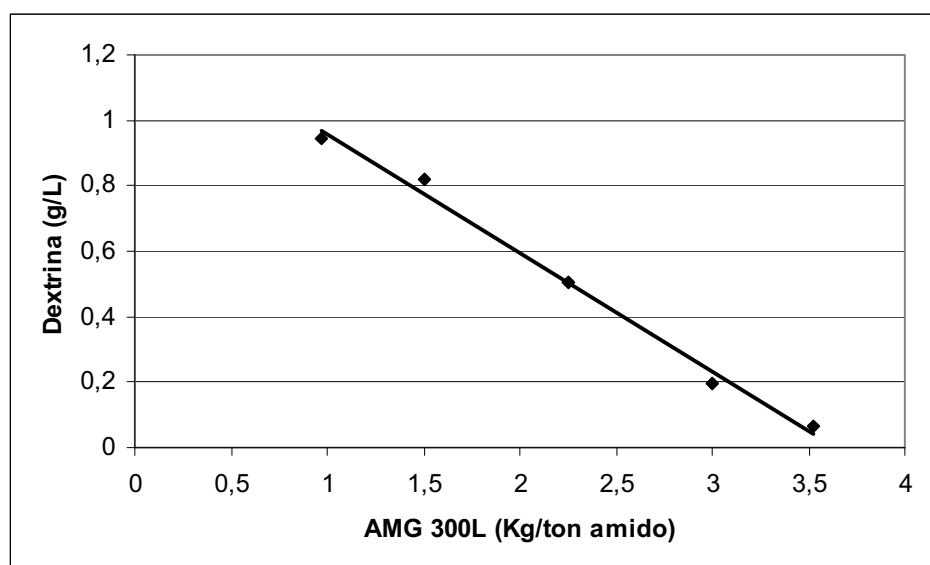


Figura 14 – Efeito da concentração de AMG 300L sobre o teor de dextrina no hidrolisado de gengibre.

As amilases de uma maneira geral, agem na superfície do grânulo de amido, provavelmente em uma imperfeição estrutural ou fissura e, depois, se estendem lateralmente formando cavidades cônicas. A ação contínua da alfa-amilase causa erosão nos grânulos que podem ser, eventualmente, dissolvidos completamente (FRENCH, 1975). Este mesmo autor verificou que a alfa-amilase se caracteriza tanto por atacar a amilose quanto a amilopectina. O complexo enzima-substrato formado possui uma conformação ideal para a catálise. A ligação da direita está mais fracamente associada à enzima que a da esquerda, por isso a ligação da direita se dissocia deixando este lugar desocupado. O fragmento da esquerda se rearranja para ocupar todo o lugar da ligação. Esse processo produz um complexo enzima-substrato com geometria ideal para as catálises posteriores. Como a alfa-amilase não consegue quebrar as ramificações, a hidrólise da amilopectina é limitada, fazendo com que sejam produzidas dextrinas limites ou oligossacarídeos, que possuem todos os pontos de ramificação,

são as amiloglucosidasas que vão terminar de quebrar as cadeias maiores (dextrinas) em glicose quando a concentração dessa enzima não é suficiente o processo de hidrólise é parcial.

4.2.3. Rendimento do Processo

Através da análise de regressão pôde-se observar efeito significativo ($p < 0,05$) dos fatores concentração de Termamyl e da AMG sobre este parâmetro. Contudo, não foi observado efeito significativo da interação dos fatores. Os valores de rendimento do processo variaram de 55,41% a 75,66%, sendo estes mínimos e máximos respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 9. As Tabelas 12 e Apêndice 3 representam os coeficientes de regressão estimados para o rendimento do processo de hidrólise. O modelo ajustado deu origem à equação 3 que determina o rendimento de processo, sendo:

$$\text{Rendimento de Processo} = 56,4653 + 5,8213T + 2,2177\text{AMG} + 3,7995T^2 + 5,4217\text{AMG}^2$$

(Equação 3)

A Figura 15 demonstra os valores de rendimento em função das concentrações das enzimas Termamyl 2X e AMG 300L utilizadas, caracterizando maiores rendimentos quando as concentrações dessas enzimas são elevadas.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o rendimento do processo (%) dos hidrolisados de gengibre (modelo ajustado).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	56,4653				
Termamyl (L)	5,8213	0,8852	1		0,0006
AMG (L)	2,2177	0,8852	1		0,0462
Termamyl (Q)	3,7995	1,0563	1		0,0114
AMG (Q)	5,4217	1,0563	1		0,0022
R ²	0,9308				

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	4	504,3617	126,09	20,17	0,0013
Resíduos	6	37,5032	6,2505		
Total	10	541,8649			

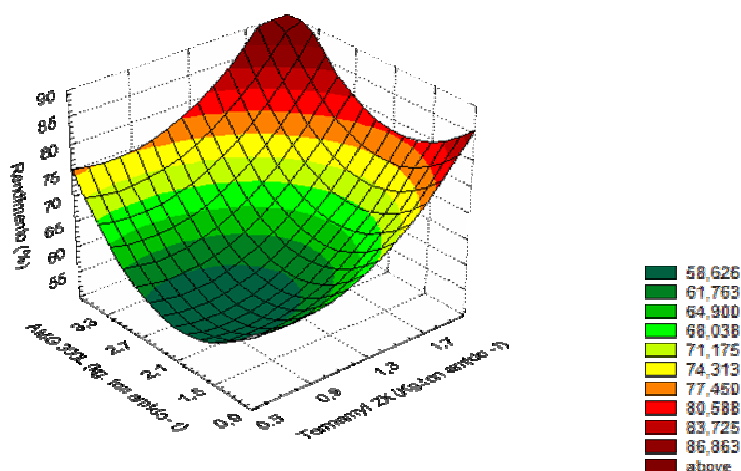


Figura 15 – Efeito da concentração de Termamyl 2X e AMG 300L sobre o rendimento do processo de hidrólise-sacarificação de suspensão de gengibre.

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permite a construção de modelos matemáticos que possibilitam a interpretação e a descrição quantitativa das relações existentes entre as variáveis dependentes (resposta) e as variáveis independentes (fatores) que se pretende estudar. Esta metodologia normalmente é utilizada quando deseja-se maximizar ou minimizar uma determinada resposta, representando, portanto, uma tentativa de otimização.

Os modelos ajustados deram origem à equações que estabelecem modelos preditivos usados no diagnóstico para estabelecer qual tratamento foi o mais eficiente, quando todos os parâmetros são avaliados em conjunto. Assim, o Tratamento 4, onde foram utilizados 1,6 Kg/t de amido de Termamyl 2X e 3,0 L/ t amido de AMG 300L, demonstrou ser o mais eficiente.

4.3 Terceiro ensaio

Este ensaio teve por objetivo avaliar o efeito da concentração de inóculo, do tempo e da temperatura de fermentação sobre o teor de etanol, metanol, glicerol,

teores de açúcares residuais e porcentagem de crescimento celular no vinho, bem como, o perfil de componentes voláteis após a destilação do vinho.

4.3.1 Análises do vinho

Na fermentação alcoólica o açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos.

Segundo Corazza et al. (2001) a obtenção do fermentado se dá pela fermentação alcoólica, por difusão, que é o tipo de fermentação em que se obtêm essencialmente etanol, mas que compreende um grupo de reações onde são produzidos também outros álcoois, como o metanol, por exemplo. A legislação brasileira estabelece que o fermentado é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% em volume, a 20 °C, obtida da fermentação alcoólica do mosto da matéria prima escolhida (BRASIL, 2006).

Os resultados obtidos para os teores de etanol, metanol, glicerol e açúcares residuais analisados em CLAE, bem como, porcentagem de crescimento celular, estão apresentados na Tabela 13.

4.3.1.1 Etanol

Conforme superfície de resposta o teor de etanol nos diferentes tratamentos variaram de 10,54 g/L a 35, 61 g/L. Através da análise de regressão observou-se o efeito linear da temperatura de fermentação sobre o teor de etanol (Tabelas 14 e Apêndice 4). O modelo ajustado deu origem à equação 4 que determina a concentração de etanol, sendo:

$$\text{Etanol} = 25,75 - 3,4375\text{Temp (Equação 4)}$$

Tabela 13 – Resultados médios da análise cromatográfica do vinho de gengibre para valores de glicose inicial, final, etanol, metanol, glicerol, sacarose, maltose e outros açúcares.

Trat	Variáveis codificadas			Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes							
	X1	X2	X3	Tempo (h)	Temp. (°C)	Conc. Leved(%)	etanol g/L	sacarose g/L	glicerol g/L	metanol g/L	maltose g/L	glicose g/L	Cresc. Cel. (%)
1	-1	-1	-1	20	26	0,75	28,438	3,987	4,488	0,000	10,058	0,439	280,65
2	-1	-1	1	20	26	2,25	28,733	3,857	6,101	0,000	13,65	0,375	128,57
3	-1	1	-1	20	34	0,75	30,041	4,130	4,990	0,000	8,998	0,394	291,43
4	-1	1	1	20	34	2,25	25,650	4,120	4,560	0,000	12,560	0,322	168,75
5	1	-1	-1	30	26	0,75	33,520	4,150	6,520	0,000	9,120	0,267	254,84
6	1	-1	1	30	26	2,25	35,610	3,840	7,840	0,000	13,570	0,461	90,48
7	1	1	-1	30	34	0,75	19,870	3,860	5,970	0,040	12,560	0,403	165,12
8	1	1	1	30	34	2,25	25,690	4,080	6,350	0,000	13,560	0,239	129,41
9	- α	0	0	17	30	1,50	20,390	3,870	3,560	0,000	12,650	0,506	150,00
10	+ α	0	0	33	30	1,50	24,560	3,990	6,580	0,000	11,350	0,445	194,44
11	0	- α	0	25	23	1,50	23,560	4,160	4,230	0,000	10,250	0,325	316,67
12	0	+ α	0	25	37	1,50	10,540	4,130	4,560	0,200	12,670	0,406	116,67
13	0	0	- α	25	30	0,22	15,460	4,090	3,980	0,100	13,920	0,328	277,78
14	0	0	+ α	25	30	2,80	16,560	4,120	3,790	0,100	13,140	0,303	157,69
15	0	0	0	25	30	1,50	29,760	4,110	5,990	0,150	9,350	0,244	183,19
16	0	0	0	25	30	1,50	29,310	4,050	5,680	0,165	9,230	0,294	182,12
17	0	0	0	25	30	1,50	29,560	3,987	4,980	0,100	9,640	0,275	180,56
18	0	0	0	25	30	1,50	29,450	4,120	5,760	0,150	8,990	0,289	182,90
19	0	0	0	25	30	1,50	28,980	4,080	5,350	0,160	9,120	0,283	183,42
20	0	0	0	25	30	1,50	29,420	4,150	5,190	0,150	9,410	0,272	181,61

X1= Tempo de fermentação (horas); X2= Temperatura de fermentação (°C); X3= Concentração de levedura (% p.p).

Os resultados mostraram que o teor de etanol foi menor para tratamentos submetidos a temperaturas mais altas. Os tratamentos que obtiveram maiores teores de etanol encontravam-se na faixa de temperatura ambiente entre 22 a 25°C (Tabela 14, Figura 16).

Tabela 14 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de etanol no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	25,75				
Temperatura (L)	-3,4375	1,5659	1	0,0415	
R ²	0,2112				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	1	161,39	161,39	4,82	0,0415
Resíduos	18	602,82	33,49		
Total	19	764,20			

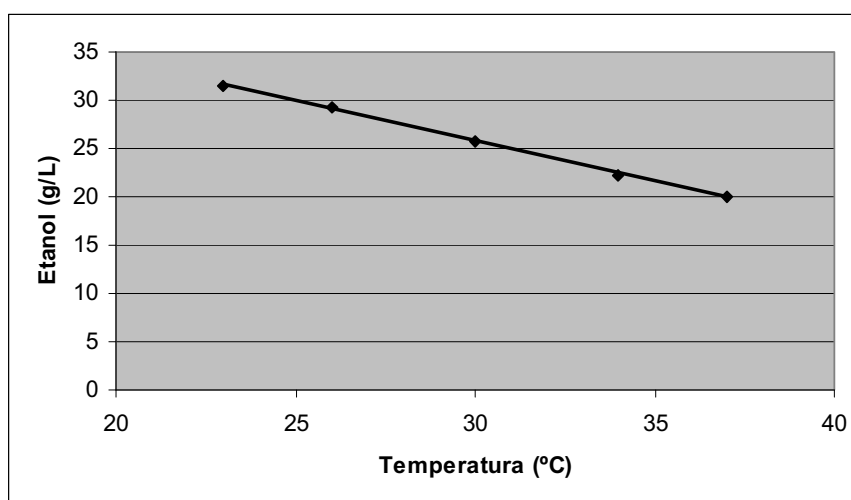


Figura 16 – Efeito da temperatura sobre quantidade de etanol produzida no vinho

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes que afetam a fermentação, influenciando o metabolismo da levedura e a produção de compostos voláteis. A realização da fermentação em baixas temperaturas demonstra, como efeito inicial, o prolongamento da fase Lag, assim como, a formação de alguns outros metabólitos como o

glicerol, a assimilação e metabolismo de nitrogênio se modificam nestas condições (NOVO et al., 2003).

4.3.1.2 Glicerol

Os resultados obtidos para a análise do teor de glicerol nos vinhos obtidos após os diferentes tratamentos de fermentação mostraram uma variação de 3,56 g/L a 6,58 g/L. As Tabelas 15 e Apêndice 5 mostram a análise dos coeficientes de regressão para os modelos completo e ajustado. O modelo ajustado deu origem à equação 5 que determina a concentração de glicerol no vinho, sendo:

$$\text{Glicerol} = 5,3234 + 0,8508\text{Tempo} \text{ (Equação 5)}$$

Os resultados mostraram ter ocorrido o efeito linear do tempo de fermentação sobre o teor deste composto no vinho de gengibre.

Através da Figura 17 pôde-se observar que o tempo contribuiu para o aumento dos teores de glicerol no vinho, sendo encontradas menores concentrações de glicerol nos tratamentos submetidos à menor tempo de fermentação (15 a 20 horas).

Tabela 15 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicerol no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	5,3234				
Tempo (L)	0,8508	0,2288	1	0,0016	
R ²	0,4345				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	1	9,8870	9,8870	13,83	0,0016
Resíduos	18	12,8681	0,7149		
Total	19	22,7551			

Segundo Martínez (2002), a produção de glicerol no processo fermentativo é favorecida por pHs básicos, os quais também favorecem o crescimento de

bactérias em detrimento das leveduras que são mais acidófilas. Geralmente, a maior produção de glicerol resulta em menor produção de álcool e menor rendimento do processo.

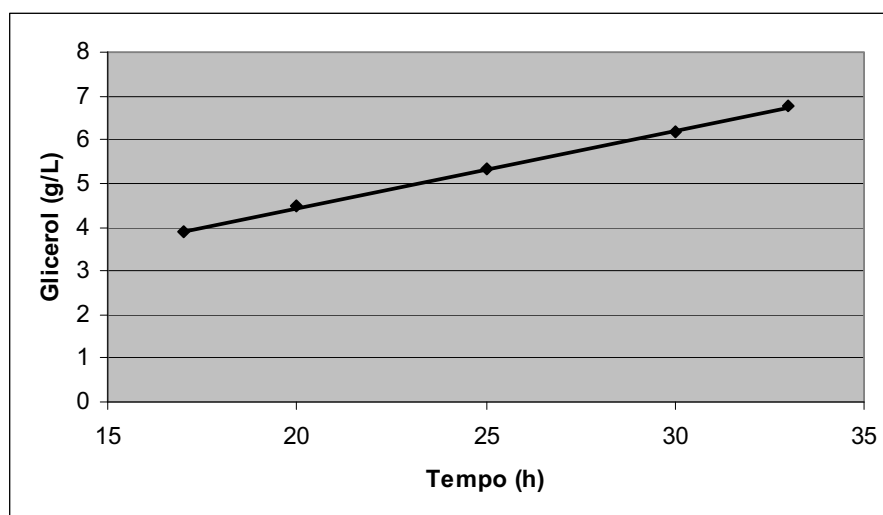


Figura 17 – Efeito do tempo de fermentação sobre quantidade de glicerol no vinho.

4.3.1.3 Metanol

Os resultados obtidos na análise de metanol nos vinhos mostraram pequenos teores deste componente com uma variação de 0 a 0,165 g/L nos diferentes tratamentos. As Tabelas 16 e Apêndice 6 apresentam os coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho nos modelos completo e ajustado. O modelo ajustado deu origem à equação 6 que determina a concentração de metanol no vinho, sendo:

$$\text{Metanol} = 0,11835 + 0,05392\text{Temperatura} - 0,05067\text{Tempo}^2 \text{ (Equação 6)}$$

Foi possível observar através da análise estatística que os fatores tempo e temperatura tiveram influência na formação de metanol.

A Figura 18 mostra que nas condições de elevada temperatura de fermentação e, condições intermediárias de tempo, os teores de metanol são maiores. De acordo

com Maia (1994), a presença de açúcares residuais ou bagacilho no vinho pode formar compostos indesejáveis, catalisados pelo aumento da temperatura e pelo pH ácido do vinho, desidratando os açúcares e hidrolisando celulose, hemicelulose e pectina, como também outros polissacarídeos do bagacilho.

Tabela 16 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,11835				
Temperatura (L)	0,05392	0,02390	1	0,0376	
Tempo (Q)	-0,05067	0,02390	1	0,0421	
R ²	0,3685				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	2	0,0774	0,03870	4,96	0,0201
Resíduos	17	0,13265	0,00780		
Total	19	0,21004			

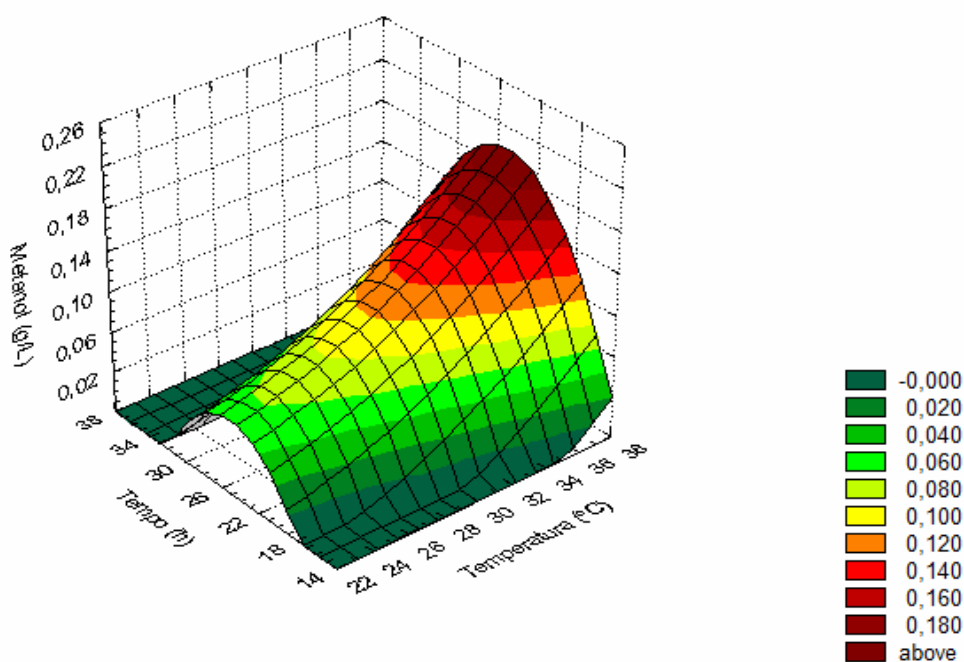


Figura 18 – Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de metanol no vinho, com a concentração de levedura em 1,5%.

4.3.1.4 Sacarose

A Tabela 17 e Apêndice 7 representam os coeficientes de regressão estimados e ANOVA para os teores de sacarose no vinho. O modelo ajustado deu origem à equação 7 que determina a concentração de sacarose residual no vinho, sendo:

Sacarose = $4,08935 - 0,06633\text{Tempo}^2 - 0,05700\text{Tempo} \times \text{Temperatura} + 0,08125\text{Temperatura} \times \text{Levedura}$ (Equação 7).

Através dos resultados obtidos pôde-se observar que houve interação dos fatores tempo e temperatura sobre o teor de sacarose no vinho e também concentração de levedura e temperatura.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de sacarose no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	4,08935				
Tempo (Q)	-0,06633	0,01890	1	0,0029	
Tempo x Temperatura	-0,05700	0,02560	1	0,0407	
Temperatura x Levedura	0,08125	0,02560	1	0,0059	
R ²	0,6309				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	3	0,14339	0,04780	9,12	0,0009
Resíduos	16	0,08389	0,00524		
Total	19	0,22728			

Através da Figura 19 observou-se que as maiores concentrações de sacarose encontravam-se na faixa de temperatura ambiente (22 a 25°C) e também em temperaturas mais elevadas na faixa de 34 a 36°C. Quanto ao tempo, pôde-se observar que nos primeiros tempos fixos de fermentação a concentração de sacarose encontrada foi menor quando comparada a tempos de 20 a 25 horas de processo fermentativo, voltando a cair quando os tratamentos foram submetidos a tempo maior de fermentação (33 a 36 horas). É possível que durante o processo, açúcares maiores (maltodextrinas) tenham sido quebrados em açúcares

menores como a sacarose em função da AMG 300L não ter sido inativada. A maior concentração de sacarose inicialmente pode ser explicada pelo fato das leveduras não a terem utilizado no princípio do processo, dando preferência para as moléculas de glicose, que são menores dentre as fermentescíveis.

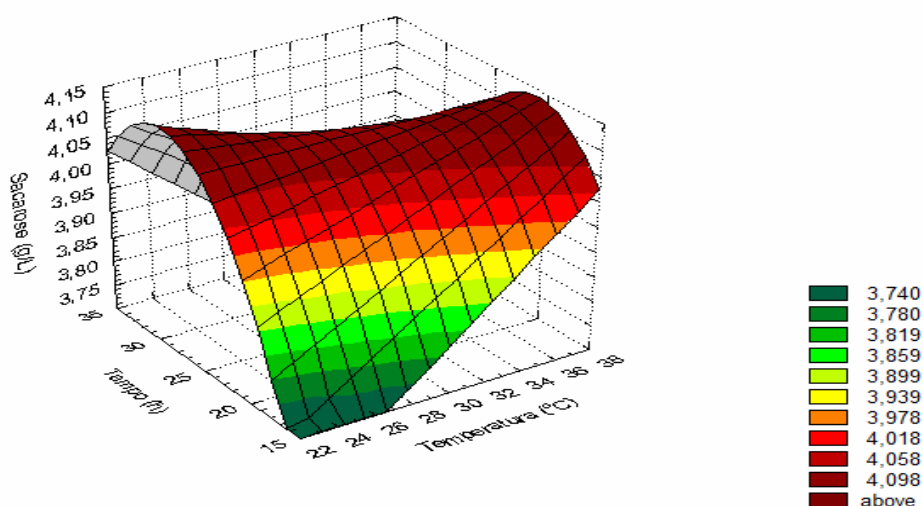


Figura 19 – Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de sacarose no vinho, com concentração de levedura de 1,5%.

Através da Figura 20 observou-se que concentrações menores de sacarose foram encontradas nos tratamentos submetidos a altas concentrações de levedura e temperaturas na faixa de 22-24°C, fatores esses, mais favoráveis à quebra de açúcares no processo fermentativo. Porém, tratamentos que foram submetidos a condições antagônicas como, temperaturas mais altas e menores concentrações de levedura, também apresentaram a mesma característica de baixa concentração de sacarose encontrada no vinho.

4.3.1.5 Maltose

Para o teor de maltose no vinho os valores encontrados variaram de 8,99 g/L a 13,92 g/L. A análise dos coeficientes de regressão mostrou terem ocorrido os efeitos

lineares e quadráticos da porcentagem de levedura inoculada, e os efeitos quadráticos do tempo e temperatura de fermentação, conforme demonstrado nas Tabelas 18 e Apêndice 8. O modelo ajustado deu origem à equação 8 que determina a concentração de maltose residual no vinho, sendo:

$$\text{Maltose} = 9,31425 + 0,82676\text{Levedura} + 0,79882\text{Tempo}^2 + 0,60795\text{Temperatura}^2 + 1,33962\text{Levedura}^2 \text{ (Equação 8)}$$

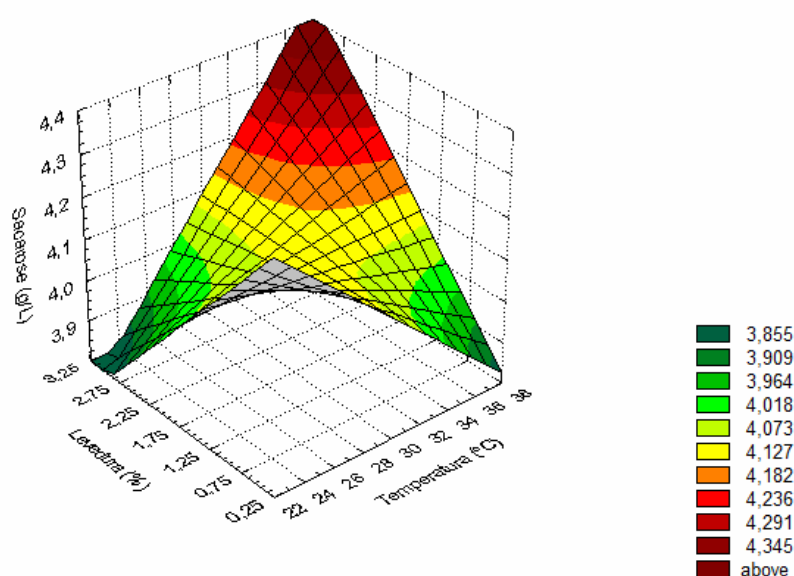


Figura 20 – Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de sacarose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas.

A superfície de resposta traçada após o ajuste do modelo (Figura 21) mostra que os menores teores deste açúcar residual são obtidos nas condições intermediárias de tempo e temperatura. Já mantendo o tempo de fermentação na condição intermediária, os menores teores de maltose ocorrem nas condições de baixa porcentagem de levedura inoculada e temperatura intermediária (Figura 22).

Tabela 18 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de maltose no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	9,31425			
Levedura (L)	0,82676	0,35407	1	0,0339
Tempo (Q)	0,79882	0,34464	1	0,0350
Temperatura (Q)	0,60795	0,34464	1	0,0981
Levedura (Q)	1,33962	0,34464	1	0,0015
R^2				

	ANOVA				
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	4	44,1828	11,0457	6,45	0,0032
Resíduos	15	25,6847	1,71231		
Total	19	69,8675			

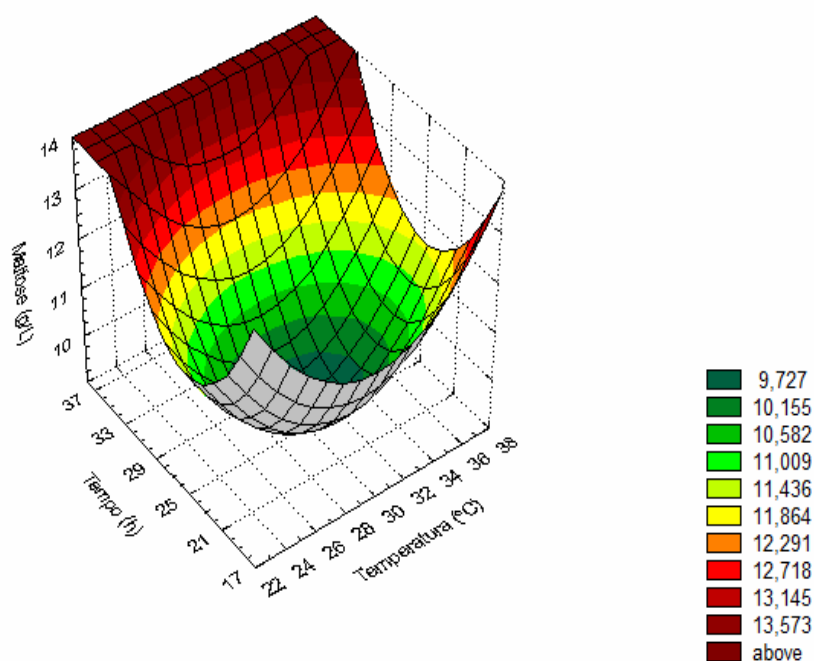


Figura 21 – Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre o teor de maltose no vinho, com a concentração de levedura em 1,5%.

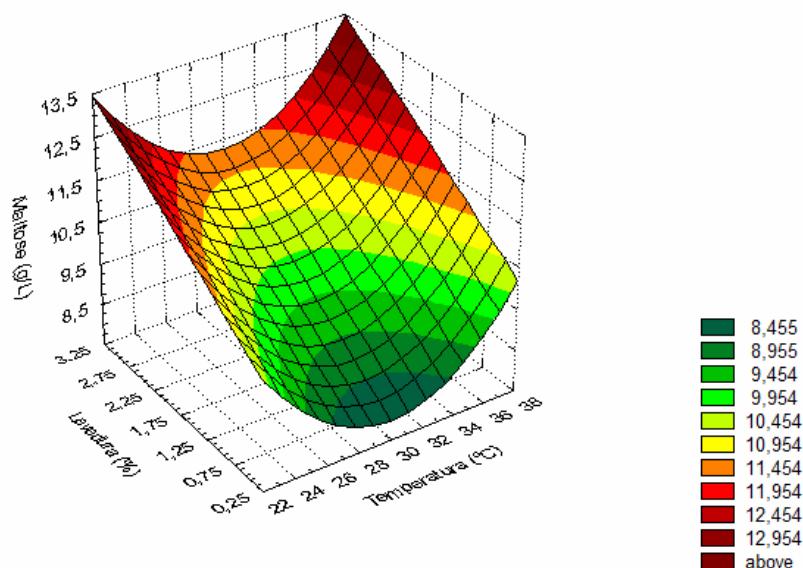


Figura 22 – Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de maltose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas.

4.3.1.6 Glicose

Para o teor de glicose residual no vinho observou-se uma variação de 0,239g/L a 0,461g/L nas diferentes condições experimentais testadas.

A análise de regressão mostrou efeito quadrático do tempo de fermentação, bem como, da interação temperatura e concentração de levedura sobre o teor deste açúcar no vinho, conforme apresentado nas Tabelas 19 e Apêndice 9. O modelo ajustado deu origem à equação 9 que determina a concentração de glicose residual no vinho, sendo:

$$\text{Glicose} = 0,30169 + 0,06123\text{Tempo}^2 - 0,04575\text{TemperaturaxTempo} \text{ (Equação 9)}$$

Nas condições de baixo tempo de fermentação e também em seu inverso o teor de glicose residual no vinho é maior, sendo os menores teores encontrados na condição intermediária de tempo (Figura 23). Já mantendo-se o tempo de fermentação fixo em 25 horas,

observa-se que menores teores de glicose residual são obtidos nas condições de baixa temperatura e baixa porcentagem de levedura inoculada e, também, na condição inversa (Figura 24).

Tabela 19 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose no vinho (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,30169				
Tempo (Q)	0,06123	0,01374	1	0,0003	
Temperatura x Levedura	-0,04575	0,01861	1	0,0250	
R ²	0,6039				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	2	0,07178	0,03589	12,96	0,0004
Resíduos	17	0,04708	0,00277		
Total	19	0,11887			

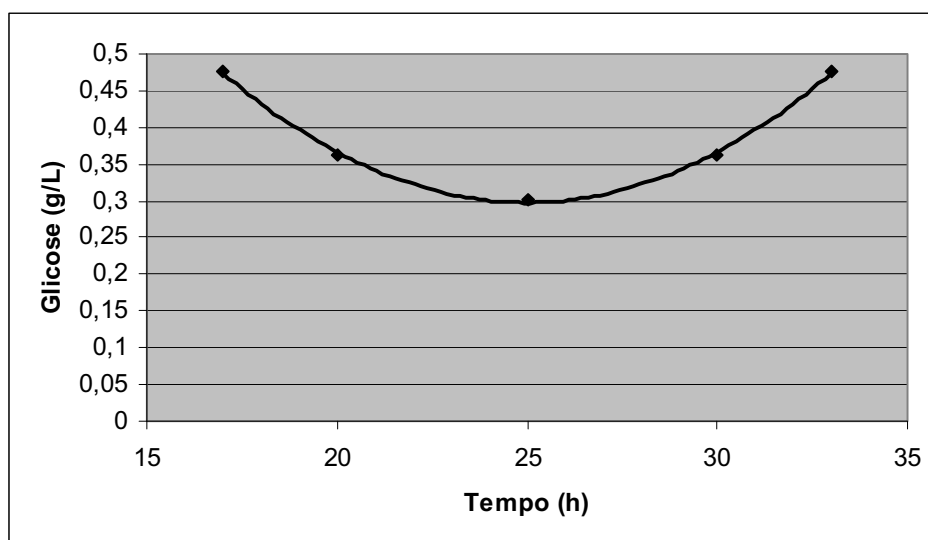


Figura 23 – Efeito do tempo sobre a concentração de glicose no vinho.

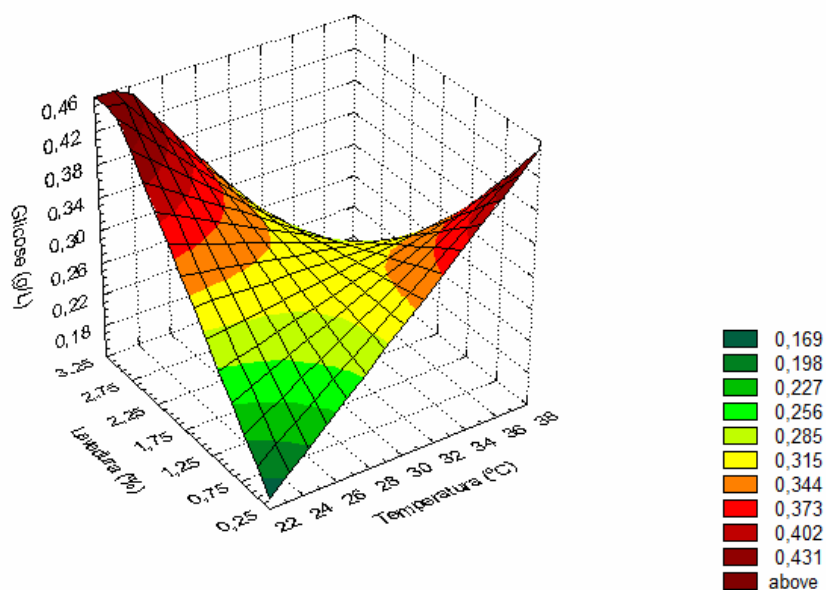


Figura 24 – Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o teor de glicose no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas.

4.3.1.7 Crescimento celular

Os resultados para o crescimento celular nos vinhos nas diferentes condições de fermentação variaram de 90,48% a 316,67%. A análise dos coeficientes de regressão (Tabelas 20 e Apêndice 10) mostrou terem ocorrido efeitos lineares significativos da temperatura de fermentação e concentração de leveduras inoculadas sobre este fator. O modelo ajustado deu origem à equação 10 que determina o crescimento celular de leveduras no vinho, sendo:

$$\text{Crescimento Celular} = 190,815 - 24,6174\text{Temperatura} - 49,554\text{Levedura} \text{ (Equação 10)}$$

Tabela 20 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o crescimento celular no vinho (modelo ajustado).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	190,815				
Temperatura (L)	-24,6174	11,6388	1	0,0495	
Levedura (L)	-49,554	11,6388	1	0,0005	
R ²	0,5707				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	2	41816	20908	11,30	0,0008
Resíduos	17	31453	1850,17		
Total	19	73269			

A Figura 25 mostra que nas condições de baixa temperatura de fermentação e menor quantidade de levedura inoculada o crescimento celular foi maior, ocorrendo diminuição da taxa de crescimento com o aumento da temperatura e da concentração de levedura.

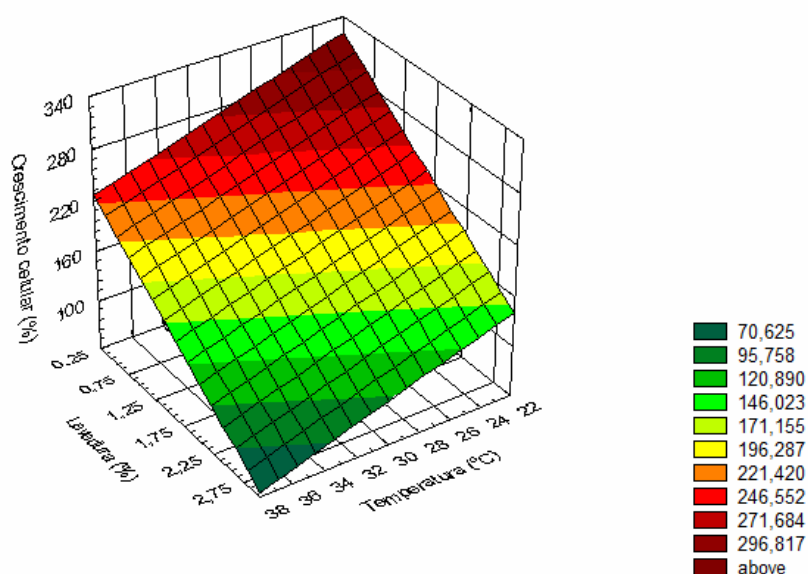


Figura 25- Efeito da temperatura de fermentação e concentração de levedura sobre o crescimento celular no vinho, com o tempo de fermentação de 25 horas.

4.3.2 Análise do destilado

A análise dos componentes voláteis como acetona, metanol e etanol são de vital importância para verificar se as características do produto estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. A acetona é encontrada normalmente no vinho nas concentrações entre 3 a 32 mg/L. A legislação brasileira sobre bebidas estabelece que a concentração máxima de metanol permitida nos vinhos de mesa é de 0,5 g/100 mL de álcool anidro, pois o metanol é tóxico aos seres humanos, provocando quando consumido vinho com concentrações acima do permitido, a queda do pH no sangue do consumidor afetando o sistema respiratório, levando à cegueira e/ou até a morte. O etanol é o principal componente do destilado, sendo apenas menor que a água.

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos no perfil de componentes voláteis encontrados após a destilação do vinho de gengibre nos diferentes tratamentos. Essa análise serviu para qualificar os componentes do destilado quanto as proporções de seus componentes principais.

4.3.2.1 Etanol

Para a porcentagem de etanol no destilado observou-se uma variação de 97,02 a 99,7% nos diferentes tratamentos. As Tabelas 22 e Apêndice 11 apresentam os coeficientes de regressão estimados para a porcentagem de etanol no destilado, demonstrando que houve efeito significativo da interação dos fatores tempo e concentração de levedura sobre a porcentagem de etanol no destilado. O modelo ajustado deu origem à equação 11 que determina a porcentagem de etanol no destilado, sendo:

$$\text{Etanol} = 99,37 - 0,282\text{Tempo} - 0,4977\text{Tempo}^2 - 0,4714\text{Tempo} \times \text{Temperatura} + 0,4351\text{Tempo} \times \text{Levedura} + 0,4181\text{Temperatura} \times \text{Levedura} \text{ (Equação 11).}$$

Tabela 21 – Resultado dos valores de etanol, metanol e acetona em porcentagem encontrados no destilado de gengibre em cada tratamento.

Trat	Variáveis codificadas			Variáveis independentes			Variáveis dependentes		
	X1	X2	X3	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Levedura (%)	Etanol (%)	Metanol (%)	Acetona (%)
1	-1	-1	-1	20	26	0,75	99,138	0,067	0,281
2	-1	-1	1	20	26	2,25	97,769	0,017	0,099
3	-1	1	-1	20	34	0,75	99,468	0,077	0,070
4	-1	1	1	20	34	2,25	99,196	0,014	0,203
5	1	-1	-1	30	26	0,75	99,381	0,164	0,000
6	1	-1	1	30	26	2,25	99,177	0,320	0,218
7	1	1	-1	30	34	0,75	97,250	0,029	0,247
8	1	1	1	30	34	2,25	99,294	0,022	0,293
9	- α	0	0	17	30	1,50	99,029	0,109	0,170
10	+ α	0	0	33	30	1,50	97,018	0,902	0,000
11	0	- α	0	25	23	1,50	99,073	0,332	0,205
12	0	+ α	0	25	37	1,50	99,518	0,071	0,000
13	0	0	- α	25	30	0,22	98,993	0,007	0,049
14	0	0	+ α	25	30	2,80	98,906	0,023	0,171
15	0	0	0	25	30	1,50	99,457	0,013	0,160
16	0	0	0	25	30	1,50	99,692	0,015	0,169
17	0	0	0	25	30	1,50	99,682	0,011	0,156
18	0	0	0	25	30	1,50	99,422	0,014	0,167
19	0	0	0	25	30	1,50	99,478	0,019	0,160
20	0	0	0	25	30	1,50	99,724	0,019	0,162

X1= Tempo de fermentação (horas); X2= Temperatura de fermentação (°C); X3= Concentração de levedura (% p.p).

Tabela 22 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de etanol no destilado (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	99,37				
Tempo (L)	-0,2820	0,10168	1	0,0149	
Tempo (Q)	-0,4977	0,09808	1	0,0002	
Tempo x temperatura	-0,4714	0,13286	1	0,0032	
Tempo x Levedura	0,4351	0,13286	1	0,0055	
Temperatura x Levedura	0,4181	0,13286	1	0,0071	
R ²	0,8264				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	5	9,41331	1,88266	13,33	<0,0001
Resíduos	14	1,97713	0,14122		
Total	19	11,39044			

A superfície de resposta traçada a partir do modelo ajustado mostra que nas condições de maior tempo de fermentação e menores porcentagem de levedura inoculada o destilado obtido de gengibre apresenta menor porcentagem de etanol, o que também pode ser observado na condição de baixo tempo de fermentação e elevada concentração de levedura inoculada (Figura 26).

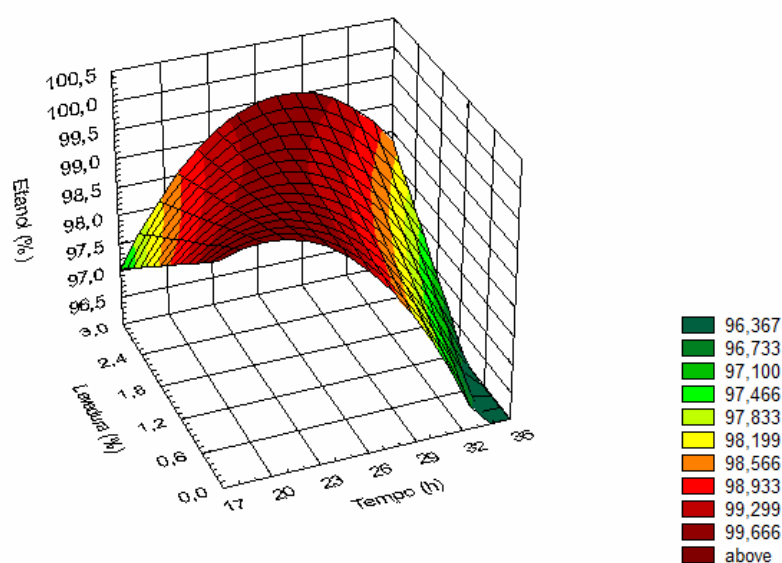


Figura 26 – Efeito da concentração de levedura e tempo de fermentação sobre a porcentagem de etanol no destilado, com a temperatura de fermentação de 30°C.

Em trabalho realizado por Lopes, (2006), na elaboração de fermentados a partir de Figo-da-Índia, o resultado foi semelhante ao encontrado neste trabalho, pois a produção do fermentado do fruto integral mostrou que maiores concentrações de levedura apresentam maiores resultados de produtividade, no entanto o percentual de conversão independe da concentração de levedura. Por outro lado, elevadas concentrações de °Brix apresentaram menores resultados de percentual de conversão, porém maiores valores de produtividade. Com relação ao fermentado da polpa do fruto da palma forrageira foi verificado que o percentual de conversão

chega ao máximo de 95% para menores concentrações de °Brix e para concentração de levedura fixada no ponto central (15 g/L ou 1,5%).

Já, mantendo-se a porcentagem de levedura inoculada em 1,5%, observa-se que nas condições de baixo tempo e temperatura de fermentação e, também, nos seus inversos, a porcentagem de etanol no destilado é menor (Figura 27).

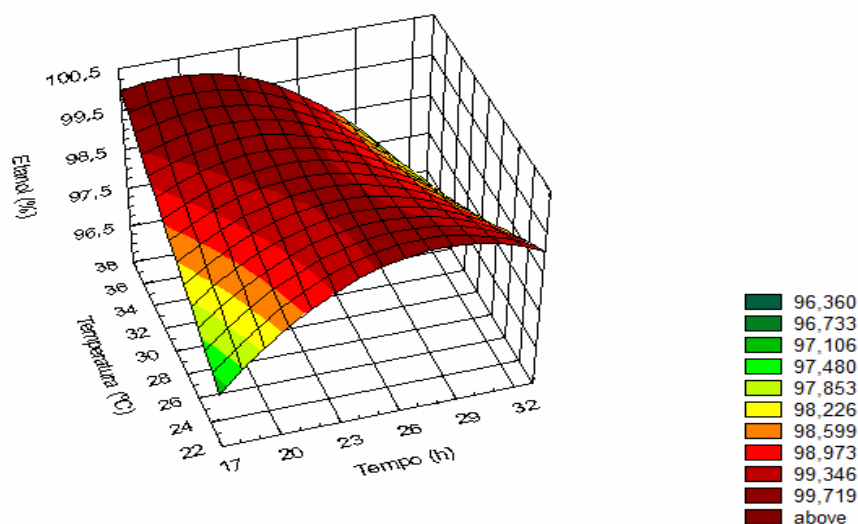


Figura 27 – Efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre a porcentagem de etanol no destilado, com a concentração de levedura de 1,5%.

Através da Figura 28 ficou constatado que concentrações altas de etanol foram produzidas nas condições de temperatura mais alta e menor tempo e, também, quando os tratamentos foram expostos a condições contrárias de baixa temperatura por um tempo maior de reação. A temperatura é condição fundamental na eficiência de fermentação pelas leveduras. A exposição a altas temperaturas por muito tempo desnatura enzimas que são responsáveis pelo processo de transformação de açúcar em etanol, prejudicando seu rendimento. Por outro lado, baixas temperaturas retardam o processo levando a um resultado mais demorado de produção de etanol, pois a velocidade de reação está diretamente ligada às condições ideais de processamento do microrganismo.

4.3.2.2 Metanol

Com relação à porcentagem de metanol no destilado as porcentagens encontradas no perfil cromatográfico variam de 0,07 a 0,9% nos diferentes tratamentos experimentais. A análise dos coeficientes de regressão (Tabelas 23 e Apêndice 12) mostra que o tempo de fermentação teve efeito significativo sobre este componente. O modelo ajustado deu origem à equação 12 que determina a porcentagem de metanol no destilado, sendo:

$$\text{Metanol} = 0,01749 + 0,12401\text{Tempo} + 0,13876\text{Tempo}^2 \text{ (Equação 12)}$$

Tabela 23 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de metanol no destilado (modelo ajustado)

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,01749				
Tempo (L)	0,12401	0,03824	1	0,0048	
Tempo (Q)	0,13876	0,03689	1	0,0016	
R ²	0,5920				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	2	0,49273	0,24637	12,33	0,0005
Resíduos	17	0,33955	0,01997		
Total	19	0,83228			

Conforme mostra a Figura 28 o aumento no tempo de fermentação leva à uma maior porcentagem de metanol no destilado, com menores porcentagens observadas na condição intermediária de tempo de fermentação.

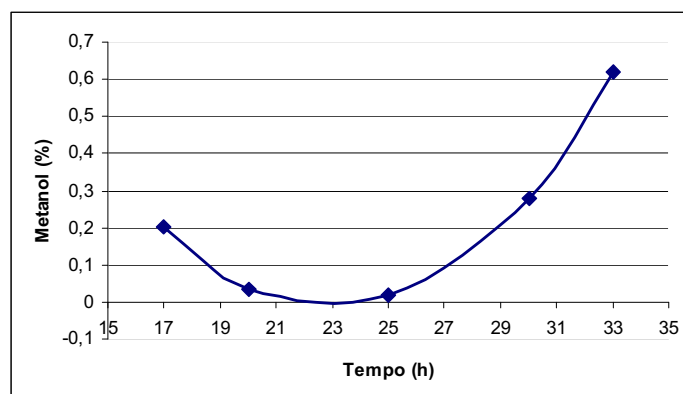


Figura 28 – Efeito do tempo de fermentação sobre a porcentagem de metanol no destilado.

Durante a fermentação, as leveduras atuam no caldo, transformando a sacarose em álcool e outras substâncias químicas. Conforme Ribeiro (1997), a dilatação do tempo de fermentação é indicativo de contaminação do caldo por microrganismos indesejáveis. Segundo esse mesmo autor, o período ideal do processo fermentativo encontra-se na faixa de 18 a 36 horas.

Em trabalho realizado por Lopes (2005), no estudo de fermentado de *Opuntia ficus* (Figo-da-Índia), por análise de cromatografia gasosa, foi verificado que a concentração de metanol no fermentado foi de 1,4 mg (100mL)⁻¹, que não representa nem 1% do máximo permitido pela legislação. Esse resultado pôde ser explicado pela retirada da pectina contida na fruta, uma vez que o metanol contido no vinho é devido à degradação da pectina. O gengibre não contém em sua composição valores consideráveis de pectina, o que pôde contribuir com a baixa formação de metanol no vinho.

4.4 Quarto ensaio

4.4.1 Análise do hidrolisado

O processo de hidrólise-sacarificação do amido presente nos rizomas de gengibre deu seqüência a outras etapas até a fase final de preparo da aguardente. Os resultados

obtidos na caracterização cromatográfica do hidrolisado de gengibre estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24- Resultados médios das análises no hidrolisado de gengibre.

Componentes (g/L)	Média
Glicose	99,39
Frutose	3,84
Maltose	4,74
Sacarose	5,43
Dextrinas	1,47

Os resultados obtidos mostraram que a glicose representa 86,52% dos açúcares obtidos, sendo observada também pequena porcentagem de dextrinas (1,3%).

Considerando que o processo iniciou com 16 Kg de suspensão contendo 10 % de amido (1600g) e 112 g de açúcares solúveis, o rendimento teórico do processo seria de 1889,77 g de açúcares fermentescíveis. Foi obtido após a etapa de filtração da suspensão hidrolisada 9000 g de hidrolisado. Com base na composição em açúcares determinadas pela cromatografia a quantidade de açúcares fermentescíveis foi de 1020,6g. Portanto, o rendimento do processo foi de 54,01%. Maiores rendimentos poderiam ser obtidos com um processo de prensagem do resíduo fibroso.

A fermentação do extrato obtido na hidrólise-sacarificação é a segunda etapa do processo de fabricação da aguardente de gengibre e consolidou os parâmetros técnicos estabelecidos para tal procedimento, para que fosse gerado o destilado. A análise dos compostos existentes no vinho é de fundamental importância para caracterizar e diagnosticar compostos indesejáveis no produto final e também para verificar se a fermentação foi eficiente.

Os resultados obtidos através da análise do vinho após o processo fermentativo do hidrolisado de gengibre está representado na Tabela 25.

Tabela 25- Resultados médios das análises no vinho de gengibre.

Componentes (g/L)	Média
Etanol	47,1
Metanol	8,5
Glicerol	6,9
Glicose	5,6

Através dos resultados obtidos no processo fermentativo pôde-se constatar que a concentração de etanol no vinho está coerente com concentrações teóricas obtidas através de cálculos de rendimento teórico de etanol a partir da quantidade de açúcares encontrados no hidrolisado. Assim tem-se que a partir de 99,3 g/L de glicose obtida na hidrólise-sacarificação descrita acima, seriam obtidos 50,96 g/L de etanol. Com o resultado obtido de 47,1 g/L de etanol, o rendimento, calculado através da divisão do valor prático sobre o teórico, chega a 92,4%, o que caracteriza um bom processo fermentativo.

4.4.2. Análise do Destilado

A destilação do vinho de gengibre compôs a última etapa do processo de fabricação de aguardente. A composição das frações destiladas está apresentada na Tabela 26.

Os resultados obtidos na destilação do vinho de gengibre mostraram que a utilização do gengibre para a obtenção de aguardente é viável uma vez que poderá agregar valor ao rizoma que não atinge os padrões de mercado. Isso é possível tendo em vista que a bebida obtida apresentou-se com aspecto incolor, e odor característico de aguardentes e cachaças, além do odor proporcionado pelos componentes presentes no gengibre. Quando comparado com outras aguardentes viu-se que se apresentava semelhante quanto alguns componentes.

Tabela 26 –Valores médios dos componentes químicos das frações destiladas do vinho de gengibre.

Componentes	Cabeça	Coração	Cauda
Teor alcoólico	70°GL	40°GL	16°GL
Acetaldeído	8,58mg/100mL	7,12mg/100mL	
Acetato de etila	-	40mg/100mL	-
Metanol	80mg/100mL	59mg/100mL	-
isopropílico	45mg/100mL	126mg/100mL	-
n-butílico	47,30mg/100mL	-	-
isoamílico	109mg/100mL	144mg/100mL	-
Acidez volátil	0,3mL/100mL	0,3mL/100mL	-
Acidez total	1,2mL/100mL	1,0mL/100mL	0,5mL/100mL
Acidez fixa	0,9mL/100mL	0,7mL/100mL	0,5mL/100mL
pH	4,79	4,80	4,61
Cobre	4,81ppm	5,95ppm	9,32ppm
Alcoóis superiores	154mg/100mL	270mg/100mL	-
Congêneres	162,8mg/L	317,42mg/L	

Em trabalho realizado por Parazzi et al (2008), caracterizando aguardente de cana-de-açúcar, pôde-se observar que o teor alcoólico, valores de acetaldeído e acetato de etila são semelhantes aos encontrados na composição da aguardente de gengibre. Os valores de metanol e cobre são superiores ao valor encontrado pelo autor (3,9 mg/100ml e 1,3mg/100ml), enquanto que os valores de acidez volátil e acidez total estão bem abaixo dos valores encontrados para a aguardente de cana-de-açúcar (17,73 mg/100ml e 23,20 mg/100ml). Em trabalho realizado por Ferreira et al (2005), que caracterizaram aguardente de mandioca, encontraram valores para acidez total de 58,8 mg/100ml.

Os valores de pH e de alcoóis superiores são semelhantes aos encontrados na aguardente de cana avaliada por Parazzi et al. (2008).

A composição química e os requisitos de qualidade para a aguardente de cana e cachaça no Brasil são também fixados pela Instrução Normativa nº 13, cujos coeficientes

de congêneres, ou seja, a somatória dos componentes voláteis “não álcool” não poderá ser inferior a 200 mg.100 mL⁻¹ e não superior a 650 mg.100 mL⁻¹ de álcool anidro, observando os seguintes limites máximos para cada componente: 150 mg.100 mL⁻¹ de álcool anidro para acidez volátil (expressa em ácido acético), 200 mg.100 mL⁻¹ de álcool anidro de ésteres (expresso em acetato de etila), 30 mg.100 mL⁻¹ de álcool anidro de aldeído totais (expresso em aldeído acético), 5 mg.100 mL⁻¹ de álcool anidro de furfural + hidroximetilfurfural e 360 mg de álcoois superiores por 100 mL de álcool anidro (expressos pela soma dos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico) (BRASIL, 2005).

Dessa forma, o valor do conjunto de componentes (álcoois superiores), não superou o limite máximo de tolerância permitido pela legislação. O teor de metanol obtido na aguardente e de n- butílico ultrapassaram o limite permitido pela legislação. O metanol poderá representar um entrave na confecção da aguardente, pois seus limites quando ultrapassados pela legislação representam toxicidade para o consumo humano. Os teores dos congêneres não ultrapassaram os limites exigidos pela legislação.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- o uso da Termamyl 2X na etapa de liquefação de suspensão de gengibre leva á obtenção de maior quantidade de glicose quando comparado com a Liquozyme Supra 2X nas condições testadas;

- para a obtenção de maior quantidade de açúcares fermentescíveis no processo de hidrólise-sacarificação de suspensão de gengibre são necessários 24h de ação da AMG 300L;

- as condições de 1,5% de levedura inoculada, 26°C e 20h de fermentação levam á obtenção de vinho com menores teores de açúcares residuais e maior teor de etanol.

- o valor de metanol encontrado na aguardente de gengibre ultrapassou o estabelecido para aguardente pela legislação.

- a aguardente de gengibre é semelhante em sua composição a aguardentes de outras matérias primas.

6 REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 7th ed. rev. St. Paul, 1983. p.378-381.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Sistema de legislação em vigilância sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 4 set. 2007.

BARDI, E. et al. Volatile by-products formed in low-temperature winw-making using immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**, Greece, v. 32, n. 7, p. 579-584, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3rd ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2007. 480 p.

BERRY, D. R.; SLAUGHTER, J. C. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic; Plenum, 2003. chap. 2, p. 25-58.

BEYNUM, G. M. A.; ROELS, J. A. Starch conversion technology. In: _____. **Food science and technology**. New York, USA: Marcel Dekker, 1985. v. 14.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, p. 60-78, 1991.

BLANCO, M. C. G. Gengibre (*Zingiber officinale*). In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA. **Manual técnico das culturas**. 5. ed. v.2 Olerícolas, Medicinais e Ornamentais. 2ed. Campinas: CATI, 1997, p.179-182.

BOZA, Y.; HORII, J. A destilação na obtenção de aguardente de cana-de-açúcar. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 98-105, 1999.

BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Legislação que dispõe sobre aguardentes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 3-4, 30 jun. 2005. Seção 1.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: Editora UFLA, 2001. 264 p.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p.1-6, 80-82, 146-151.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 1998. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)—Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd. ed. New York: John Wiley, 1957. 611 p.

COPERSUCAR. Fermentação. São Paulo: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987. v. 1, cap. 10, p. 311 - 88.

CORRÊA J.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151 p.

CROP PROFILE. Ginger. Disponível em: <http://www.spicestat.org/ginger.html>. Acesso em 04 set. 2007.

EL-DASH, A. A.; CAMARGO, C. O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, 1982. 349 p.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. *Zingiber officinale* Roscoe: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

ENZIMAS: ferramentas indispensáveis num mundo vivo. Conselho de Informação sobre Biotecnologia. 2004. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Base de dados. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 3 set. 2008.

FARIA, J. B. et al. The sensory characteristic defect of “cachaça” distilled in absence of Cooper. **Revista Alimentos Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2003.

FERREIRA, G. B. et al. **Caracterização do processo de obtenção de uma aguardente de mandioca**. Departamento de Engenharia Química, Rosa Elze, São Cristóvão-SE – Brasil. Braz. J. Food Technol., 5º SIPAL, março, 2005.

FERREIRA, J. O. **Estudo da viabilidade técnico-econômica da produção industrial da aguardente do ‘licor’ de laranja**. 2005. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

FRANCO, C. M. L. et al. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 224 p. (Série cultura de tuberosas amiláceas latino americanas, v. 1).

FRENCH, D. Chemical na biochemisry of starch. In: WHELAN, W. L. **Biochemistry**: chemistry of carbohydrates. London: Academic, 1975. v. 5, p. 269-326.

FUJII, M.; HOMMA, T.; TANIGUCHI, M. Synergism of α - amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnology Bioengineering**, v. 32, p. 910-915, 1988.

GINGER. Food Market Exchange: Bangkok, [200-?]. Disponível em: <http://www.foodmarketexchange.com/datacenter/product/herb/herb/detail/dc_pi_hs_herb0903.htm>. Acesso em: 4 set. 2007.

GRAEL, E. T.; MENEZES, T. J. B. Produção de α - amilase: características morfofisiológicas de *B. amyloliquefaciens* visando melhoramento genético. **Coletânea Instituto Tecnologia Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 70-76, 1989.

HASHIZUME, T. Considerações sobre ésteres nas bebidas alcoólicas. **Instruções Técnicas**, Campinas, n. 9, p. 109-121, 1976.

HOFFMAN, R.; VIEIRA, S. **Análise de regressão**: uma introdução à econometria. São Paulo: Hucitec, 1977. 339 p.

HORI, H. et al. Pharmacognostic studies on ginger and related drugs part 1: five sulfonated compounds from *Zingiberis rhizome* (Shokyo). **Phytochemistry**, p. 613-617, 2003.

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

INFORMAÇÕES agrícolas. Disponível em: <<http://www.morretes.pr.gov.br>>. Acesso em: 27 mai. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 2005. v. 1, p. 27-361.

JACQUES, K. ; LYONS, T. P. ; KELSALL, D. R. **The alcohol textbook**. 3rd ed. Nottingham: Nottingham Press, 1999. 386 p.

JUNQUEIRA, G. D. de A.; PIEDADE, R.; MALUF, W. R. **Produção de gengibre**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. (Boletim técnico de hortaliças, n. 25).

KANEKO, T.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. Comparison of CD composition produced by chimeric Cgtases. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 197-201, 1990.

KRUGER, J. E.; LINEBACK, D.; STAUFFER, C. E. **Enzymes and their role in cereal technology**. St. Paul: AACC, 1987. 403 p.

LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic, 2003.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANH, H, Y. Rapid determination of yeast viability. **Biothecnology Bioengineering**, n. 11, p. 641-9, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, L. N.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1985. 839 p.

LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; CEREDA, M. P. Processamento da araruta (*Maranta arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 5, p. 151-155, 2002.

LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; FERRARI, T. B. Aproveitamento do gengibre (*Zingiber officinale*) de qualidade inferior como matéria-prima amilácea. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 1, p. 9-18, 2005.

LIMA, U. A. Produção de etanol. In: _____. **Biotecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 1, p. 48- 69.

LISSA, S. L. **Cultura do gengibre**. Curitiba: EMATER/PR, 1996. 12 p.

LONIEWSKI, I. Antiemetic activity of ginger rhizome extract (*Zingiber officinale* Roscoe) and eleuterococ root extract (*Eleuthrococcus senticosus* Maxim). **Herba Polonica**, v. 44, n. 1, p. 39-44, 1998.

LOPES, R. V. V. et al. **Estudo cinético da produção de vinho do fruto da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill)**. Campina Grande: UFCG/DEQ, 2005. 95p.(Dissertação de Mestrado).

MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, jul./ago. 1994.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MONNA, M. et al. **Starch Stärke** , v. 41, p. 382-385, 1989.

MORI, F. A. et al. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 396-400, 2003.

MORRISON, W. R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. **Cereal Foods World**, v. 40, p. 437-446, 1995.

MUTTON, M. J. R.; MARTINEZ, J. V. B. I.; MUTTON, M. A.; Influência da matéria-prima e do processamento sobre a composição e qualidade da aguardente produzida em escala industrial. Piracicaba, v. 55, n. 1, jan./abr. 1998.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. **O Engarrafador Moderno**, v. 49, p. 75-77, 1997.

NEGRELLE, R. B.; ELPO, E. R. S.; RÜCKER, N. G. A. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 1022-1028, 2005.

TORRES NETO, A. B. T. et al. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 25-32, 2005.

NOVOZYMES A/SZYMES A/S. BAN: ficha técnica do produto. Disponível em: <<http://www.novoenzymes.com>> Acesso em: 23 jun. 2008.

OBEL, L. B. Putting enzymes to work in bakery applications. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 9, p. 396-399, 2001.

ONTENGO, D. C.; DAYAP, L. A.; CAPAL, T. V. Screening for the antibacterial activity of essential oils from some Philippine plants. **Acta Manilana**, v. 43, p. 19-23, 1995.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural. **Área, produção e valor bruto da produção de gengibre no Estado do Paraná**: safra 01/02. Curitiba, 2003.

PARAZZI, C. et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, jan./mar. 2008.

PEDDIE, H. A. B. Éster formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 327-331, 1990.

PERONI, F. H. G. **Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

PIMENTEL, I. C. **Enzimas amilolíticas e proteolíticas**. Piracicaba: USP, ESALQ, Departamento de Genética, 1987. 52 p. Mimeografado.

PURSEGLOVE, J. W. **Spices**. London: Logmann, 1981. v. 2, (Tropical agricultural series).

REYES, F. G. R. et al. Characterization of starch from ginger root (*Zingiber officinale*). **Starch/Stärke**, v. 34, n. 2, p. 40-44, 1982.

RIBEIRO, J. C. G. M. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Perform, 1997.

ROSE, A. H. **Alcoholic beverages**. New York: Academic, 1977. 760 p.

ROSENTHAL, F. R. T. et al. Amidos de mandioca. 2: estudos de estrutura, em variedades de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 4, p. 7-17, 1973.

SANTOS, J. A. **Aspectos sócio-econômicos da cultura do gengibre no município de Morretes - Paraná, Curitiba**. 2000. 55 f. Monografia (Graduação)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana de açúcar**. Lavras: Editora UFLA, 2001. cap. 3, p. 113-128.

SCHOCH, T. J.; MAYWALD, E. C. Microscopic examination of modified starches. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 382-387, 1956.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biology Chemistry**, n. 160, p. 69-73, 1945.

SRIKANTA, S. et al. Novel technique for saccharification of cassava fibrous waste for alcohol production. **Starch Stärke**, v. 39, n. 7, p. 234 - 37, 1987.

SUOMALAINEM, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal Institute Brewing**, v. 85, p. 149-156, 1979.

SÜHEYLA, K. D.; NAZLÝ A.; AKÝN, C. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 99-106, 2003.

TAFFARELLO, L. A. B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

TAVARES, L. B. B. **Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas**. 2004. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TAVEIRA M. M. et al. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina: parte 1: aspectos gerais, óleo essencial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 64-69, 1997.

TAVEIRA-MAGALHÃES, M. et al. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 1- aspectos gerais, óleo essencial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 64-69, 1997.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. **Practical for guides the food industry-starch**. St. Paul: Eagan, 1999. 94 p.

THOMSON, M. et al. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, p. 475-478, 2002.

TROPICAL ginger. Disponível em: <<http://www.ginger.com.br/ginger1p.htm>>. Acesso em: 26 set. 2007.

UTPALENDU, J.; CHATTOPADHYAY, R. N.; PRASAD, S. B. Preliminary studies on anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Vitex negundo* Linn. and *Tinospora cordifolia* (Willid) Miers in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 232-233, 1999.

VAN DER BURGHT, Y. E. M. et al. Structural studies on methylated starch granules. **Starch/Stärke**, v. 52, n. 2-3, p. 40-43, 2000.

VIEIRA, F. C. **Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), de batata doce (*Ipomoea batatas*) e de gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2004. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

WINDHOLSZ, M. (Ed.). **The merk index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway: MerK, 1976.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Molecular structure of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Eds.). **Starch**: chemistry an technology. New York: Academic, 1984. p. 153-182.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva, 1999. v. 1.

YOSHIKAWA, M. Stomachic principles in ginger. III: an anti-ulcer principle, 6-gingesulfonic acid, and three monoacyldigalactosylglycerols, gingerglycolipids A, B and C, from Zingiberis Rhizoma originating in Taiwan. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1226-1230, 1994.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch/Stärke**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 1988.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose (g L^{-1}) nos hidrolisados de gengibre.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	81,45			
Termamyl (L)	8,40	1,3756	1	0,0017
AMG (L)	3,21	1,3756	1	0,0668
Termamyl (Q)	5,45	1,6414	1	0,0210
AMG (Q)	7,81	1,6414	1	0,0051
Termamyl (L) x AMG (L)	0,75	1,9425	1	0,7135
R ²	0,9330			

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	5	1050,61	210,12	13,92	0,0059
Resíduos	5	75,46	15,09		
Total	10	1126,07			

Apêndice 2 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	0,305			
Termamyl (L)	-0,07	0,098	1	0,4877
AMG (L)	-0,311	0,098	1	0,0253
Termamyl (Q)	0,110	0,118	1	0,3901
AMG (Q)	0,166	0,118	1	0,2184
Termamyl (L) x AMG (L)	0,098	0,139	1	0,5142
R ²	0,726342			

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	5	1,0352	0,207	2,65	0,1539
Resíduos	5	0,3900	0,78		
Total	10	1,4253			

Apêndice 3 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de dextrina (g/L) nos hidrolisados de gengibre.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	56,4653			
Termamyl (L)	5,8213	0,9556	1	0,0017
AMG (L)	2,2177	0,9556	1	0,0680
Termamyl (Q)	3,7995	1,140	1	0,0207
AMG (Q)	5,4217	1,140	1	0,0051
Termamyl (L) x AMG (L)	0,5200	1,3494	1	0,7158
R ²	0,9327			

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	5	505,4433	101,0886	13,88	0,0059
Resíduos	5	36,4216	7,2843		
Total	10	541,8649			

Apêndice 4 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de etanol no vinho

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor
Média	29,0727			
Tempo (L)	0,6474	1,6521	1	0,7034
Temperatura (L)	-3,4375	1,6521	1	0,0641
Levedura (L)	0,4147	1,6521	1	0,8069
Tempo (Q)	-0,2184	1,6080	1	0,8946
Temperatura (Q)	-2,1360	1,6080	1	0,2136
Levedura (Q)	-2,5036	1,6080	1	0,1506
Tempo x temperatura	-2,7612	2,1587	1	0,2297
Tempo x Levedura	1,5007	2,1587	1	0,5028
Temperatura x Levedura	-0,1195	2,1587	1	0,9569
R ²	0,5122			

ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	391,40	43,49	1,17	0,4041
Resíduos	10	372,80	37,28		
Total	19	764,20			

Apêndice 5 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicerol no vinho

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	5,4445				
Tempo (L)	0,08508	0,2583	1	0,0081	
Temperatura (L)	-0,1848	0,2583	1	0,4907	
Levedura (L)	0,1877	0,2583	1	0,4841	
Tempo (Q)	0,1608	0,2514	1	0,5387	
Temperatura (Q)	-0,07854	0,2514	1	0,7611	
Levedura (Q)	-0,2588	0,2514	1	0,3275	
Tempo x temperatura	-0,1251	0,3375	1	0,7185	
Tempo x Levedura	0,0646	0,3375	1	0,8520	
Temperatura x Levedura	-0,3729	0,3375	1	0,2951	
R ²	0,5996				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	13,6448	1,5161	1,66	0,2193
Resíduos	10	9,1103	0,9110		
Total	19	22,7551			

Apêndice 6 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de metanol no vinho.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,1461				
Tempo (L)	0,0293	0,0171	1	0,1180	
Temperatura (L)	0,0539	0,0171	1	0,0104	
Levedura (L)	-0,0293	0,0171	1	0,1180	
Tempo (Q)	-0,05405	0,0166	1	0,0088	
Temperatura (Q)	-0,0187	0,0166	1	0,2879	
Levedura (Q)	-0,0187	0,0166	1	0,2879	
Tempo x temperatura	0,0500	0,0223	1	0,0494	
Tempo x Levedura	-0,0500	0,0223	1	0,0494	
Temperatura x Levedura	-0,0500	0,0223	1	0,0494	
R ²	0,8094				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	0,1700	0,0188	4,72	0,0118
Resíduos	10	0,0400	0,0040		
Total	19	0,2100			

Apêndice 7 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de sacarose no vinho

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	4,0846				
Tempo (L)	0,0028	0,0230	1	0,9066	
Temperatura (L)	0,0224	0,0230	1	0,3542	
Levedura (L)	-0,0131	0,0230	1	0,5807	
Tempo (Q)	-0,0657	0,0224	1	0,0149	
Temperatura (Q)	0,0102	0,0224	1	0,6575	
Levedura (Q)	-0,0039	0,0224	1	0,8654	
Tempo x Temperatura	-0,0570	0,0301	1	0,0874	
Tempo x Levedura	0,0062	0,0301	1	0,8396	
Temperatura x Levedura	0,0812	0,0301	1	0,0223	
R ²	0,6814				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	0,1549	0,0172	2,38	0,0969
Resíduos	10	0,0724	0,0072		
Total	19	0,2273			

Apêndice 8 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de maltose no vinho

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	9,3142				
Tempo (L)	0,0994	0,3598	1	0,7880	
Temperatura (L)	0,3917	0,3598	1	0,3018	
Levedura (L)	0,8267	0,3598	1	0,0444	
Tempo (Q)	0,7988	0,3502	1	0,0457	
Temperatura (Q)	0,6079	0,3502	1	0,1133	
Levedura (Q)	1,3396	0,3502	1	0,0033	
Tempo x temperatura	0,6975	0,4701	1	0,1688	
Tempo x Levedura	-0,2130	0,4701	1	0,6602	
Temperatura x Levedura	-0,4350	0,4701	1	0,3767	
R ²	0,7469				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	52,1824	5,7980	3,28	0,0391
Resíduos	10	17,6850	1,7685		
Total	19	69,8675			

Apêndice 9 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para o teor de glicose no vinho

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,01771				
Tempo (L)	-0,0192	0,0141	1	0,2027	
Temperatura (L)	-0,0035	0,0141	1	0,8092	
Levedura (L)	-0,01084	0,0141	1	0,4599	
Tempo (Q)	0,0642	0,0137	1	0,0009	
Temperatura (Q)	0,0253	0,0137	1	0,0948	
Levedura (Q)	0,0077	0,0137	1	0,5892	
Tempo x temperature	0,0015	0,0184	1	0,9367	
Tempo x Levedura	0,0207	0,0184	1	0,2864	
Temperatura x Levedura	-0,0457	0,0184	1	0,0324	
R ²	0,7715				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	0,09170	0,01019	3,75	0,0256
Resíduos	10	0,02716	0,00271		
Total	19	0,1188			

Apêndice 10 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para crescimento celular no vinho.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	182,774				
Tempo (L)	-11,334	12,4967	1	0,3858	
Temperatura (L)	-24,617	12,4967	1	0,0772	
Levedura (L)	-49,554	12,4967	1	0,0027	
Tempo (Q)	-6,675	12,1636	1	0,5952	
Temperatura (Q)	9,036	12,1636	1	0,4746	
Levedura (Q)	9,413	12,1636	1	0,4569	
Tempo x temperature	-12,719	16,3286	1	0,4541	
Tempo x Levedura	9,336	16,3286	1	0,5801	
Temperatura x Levedura	19,756	16,3296	1	0,2541	
R ²	0,7089				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	51939,49	5771,05	2,71	0,0685
Resíduos	10	21329,75	2132,97		
Total	19	73269,25			

Apêndice 11 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de etanol no destilado

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	99,57				
Tempo (L)	-0,2820	0,1003	1	0,0184	
Temperatura (L)	0,0360	0,1003	1	0,7271	
Levedura (L)	0,0039	0,1003	1	0,9701	
Tempo (Q)	-0,5218	0,0976	1	0,0003	
Temperatura (Q)	-0,0722	0,0976	1	0,4764	
Levedura (Q)	-0,1945	0,0976	1	0,0743	
Tempo x temperature	-0,4714	0,1310	1	0,0049	
Tempo x Levedura	0,4351	0,1310	1	0,0077	
Temperatura x Levedura	0,4181	0,1310	1	0,0096	
R ²	0,8795				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	10,02	1,11	8,11	0,0015
Resíduos	10	1,37	0,13		
Total	19	11,39			

Apêndice 12 - Coeficientes de regressão estimados e ANOVA para a porcentagem de metanol no destilado

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	GL	<i>p</i> valor	
Média	0,0205				
Tempo (L)	0,1240	0,0395	1	0,0105	
Temperatura (L)	-0,0633	0,0395	1	0,1398	
Levedura (L)	0,0046	0,0395	1	0,9094	
Tempo (Q)	0,1384	0,0384	1	0,0048	
Temperatura (Q)	0,0309	0,0384	1	0,4394	
Levedura (Q)	-0,0350	0,0384	1	0,3842	
Tempo x temperature	-0,0550	0,0516	1	0,3115	
Tempo x Levedura	0,0327	0,0516	1	0,5398	
Temperatura x Levedura	-0,022	0,0516	1	0,6788	
R ²	0,7441				
ANOVA					
	GL	SQ	QM	F valor	Pr>F
Regressão	9	0,6193	0,0688	3,23	0,0409
Resíduos	10	0,2129	0,0213		
Total	19	0,8323			